Aus dem Institut für Pharmakologie der Universität Düsseldorf
und
dem Institut für Pharmakologie, Bayer AG, Wuppertal-Elberfeld
Direktoren: Prof. Dr. K. Greeff, Prof. Dr. F. Hoffmeister

Untersuchungen über den Einfluß von Heparin auf die Entwicklung experimentell induzierter atherosklerotischer Frühstadien in der Arteria carotis von Ratten

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Hardy Sohnius und Stefan Wohlfeil

1982

Aus dem Institut für Pharmakologie der Universität Düsseldorf

und

dem Institut für Pharmakologie, Bayer AG, Wuppertal-Elberfeld

Direktoren: Prof. Dr. K. Greeff, Prof. Dr. F. Hoffmeister

Untersuchungen über den Einfluß von Heparin auf die Entwicklung experimentell induzierter atherosklerotischer Frühstadien in der Arteria carotis von Ratten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Hardy Sohnius und Stefan Wohlfeil

1982

"Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Düsseldorf"

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. H. Th. Brüster

Referent
gez.: Prof. Dr. F. Hoffmeister

Korreferent
gez.: Prof. Dr. K. Greeff

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung von Herrn Professor Dr. med. Dipl.-Chem. Friedrich Hoffmeister im Institut für Pharmakologie der Bayer AG, Wuppertal-Elberfeld durchgeführt.

Herrn Professor Hoffmeister, Leiter des Instituts für Pharmakologie der Bayer AG, danken wir für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes zur Durchführung des experimentellen Teils unserer Dissertation.

Ferner sind wir Herrn Dr. rer. nat. Friedel Seuter im Institut für Pharmakologie der Bayer AG für seine freundliche Unterstützung und zahlreichen Ratschläge zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. rer. nat. Wolf-Heinrich Voigt im Institut für Immunologie und Onkologie der Bayer AG danken wir für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Präparate, insbesondere für die hilfreiche Unterstützung bei deren Auswertung.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535703_0027

I N H A L T

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Methoden	7
2.1	Tiere	7
2.2	Futter	7
2.3	Wirkstoff, Dosis und Applikation	8
2.4	Operations- und Unterkühlungstechnik	8
2.5	Blutgewinnung und Präparation der Intimaproliferation	9
2.6	Sudan-IV-Färbung der Gefäßwand und Reextraktion des Farbstoffs	9
2.7	Bestimmung des Proliferationsgewichts	1o
2.8	Eiweißgehalt der Proliferation	1o
2.9	Bestimmung der Partiellen Thromboplastinzeit	11
2.1o	Permeabilitätsuntersuchung mit Evans Blue	11
2.11	Bestimmung der Triglyceride im Plasma	12
2.12	Histologische Untersuchungen	12
2.12.1	Lichtmikroskopie	12
2.12.2	Elektronenmikroskopie	12
2.13	Statistische Berechnungen	13
3.	Versuchsdurchführung und Ergebnisse	15
3.1	Antiproliferative, dosisabhängige Wirksamkeit von Heparin	15
3.2	Operationsbedingte Permeabilitätsänderung, zeitlicher Verlauf und Beeinflussung durch Heparin	19
3.3	Entwicklung der Proliferation bis zum 1o. Tag	22
3.4	Untersuchung der Wirksamkeit von Heparin bei Variation von Applikationsbeginn und -dauer	23
3.4.1	Untersuchung nach 1o Tagen	23

		Seite
3.4.1	Untersuchung nach 2o Tagen	25
3.5	Histologische Untersuchungen	28
3.5.1	Lichtmikroskopische Ergebnisse	29
3.5.2	Elektronenmikroskopische Ergebnisse	34
4.	Diskussion	44
5.	Zusammenfassung	53
6.	Tabellen	54
7.	Literatur	63
	Lebensläufe	72

1. E I N L E I T U N G

Häufigste Ursache kardio-vaskulärer Krankheiten, die in Industrieländern an der Spitze der Sterbestatistiken stehen, ist die Atherosklerose (1,5,19,32,59,66,78). Hinsichtlich ihrer Pathogenese stehen sich im wesentlichen zwei Theorien seit über 1oo Jahren gegenüber: die thrombogene und die Lipidinfiltrationstheorie. Erstere wurde 1852 von Rokitansky (63) begründet und 1949 von Duguid (21) wieder aufgegriffen. Beide Autoren vertraten die Ansicht, daß atherosklerotische Gefäßveränderungen auf der zellulären Organisation arterieller Thromben beruhen. Demgegenüber besagt die Lipidinfiltrationstheorie, die auf Virchow (84) zurückgeht, daß der Einstrom von Plasmalipiden in die Arterienwand das initiale Geschehen darstellt.

Schon 1913 gelang es Anitschkow (2), durch eine cholesterinreiche Diät atherosklerotische Veränderungen bei Kaninchen hervorzurufen. Neben diesem Prinzip der experimentellen Hyperlipidämie finden heute zahlreiche andere Methoden Anwendung (auch in Kombination mit einer Fettdiät): mechanische Alteration (6,7,8,15,27,29,4o,58,64,77,79,8o,86), Perfusion der Arterie mit Luft (16,17,18,25,38), Unterkühlung eines Arterienabschnitts (4o,73,75,82), elektrische Reizung (72,86), Bestrahlung (48), ferner chemische (31,39,47,62) sowie immunologische Noxen (28,33,34,49,56). Bei den meisten dieser Modelle kommt es zu einer Schädigung oder zum Verlust des Gefäßendothels. Im weiteren Verlauf scheint es im deendothelialisierten Bereich trotz unterschiedlicher Noxen, zu einer uniformen Reaktion der Gefäßwand zu kommen. Diese besteht in der Bildung fibromuskulärer Plaques, die weitestgehend den atherosklerotischen Frühstadien beim Menschen entsprechen (8,27,58,68). Zahlreiche Untersucher kamen zu dem Ergebnis, daß es sich bei der genannten Intimaverdickung offenbar um eine Proliferation modifizierter glatter Muskelzellen nach Migration aus der Media handelt (15,25,4o,47,57,67,79,83). Es existieren ver-

schiedene Hypothesen zum Pathomechanismus dieses Vorgangs. Für eine endgültige Klärung bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

Bei einer Reihe von Versuchen konnte gezeigt werden, daß es im Bereich der Endothelschädigung einerseits zu einer Thrombozytenadhäsion und -aggregation kommt (7,27,47,57,62, 77,79), andererseits zu einer Erhöhung der Permeabilität (7, 6o,76). Die Entdeckung eines Thrombozytenfaktors (PDGF = platelet-derived growth factor), der die Proliferation arterieller glatter Muskelzellen in vitro stimuliert (65), sowie die Tatsache, daß bei Thrombozytopenie unter experimentellen Bedingungen Intimaproliferationen verhindert werden können (29), weisen darauf hin, daß den Thrombozyten vermutlich eine große Bedeutung bei experimentellen myointimalen Veränderungen zukommt.

Im Hinblick auf Prophylaxe und Therapie der Atherosklerose sind zahlreiche Pharmaka sowohl tierexperimentell als auch klinisch untersucht worden: Hypolipidämika (24,3o,61), Glukokortikoide (12,15,42), nichtsteroidale Antiphlogistika und Thrombozytenaggregationshemmer wie Aspirin (3,17,42), sowie Mitosehemmer (Colchizin) und antiproliferative Substanzen (42,43). Hierbei sind unterschiedliche, zum Teil widersprüchliche Ergebnisse erzielt worden. Versuche mit Heparin und anderen, teilweise nicht antikoagulatorisch wirksamen Mucopolysacchariden zeigten einen deutlichen antiatherosklerotischen Effekt dieser Stoffe (18,2o,37,71), dessen Mechanismus allerdings noch ungeklärt ist.

Die körpereigene Substanz Heparin ist chemisch nicht eindeutig determiniert und gehört systematisch zu den Glykosaminoglykanen (11). Es besteht aus verschieden langen und unterschiedlich häufig sulfatierten Polysaccharidketten, die stark elektronegativ geladen sind. Das breite pharmakologische Wirkungsspektrum des Heparins resultiert einer-

seits aus seiner starken Neigung zur Komplexbildung, andererseits aus seiner strukturellen Inhomogenität (45, 46). So beeinflußt Heparin neben verschiedenen Zellarten, Hormonen und biogenen Aminen die Aktivität von 5o Enzymen (45).

Bei der antikoagulatorischen Wirkung katalysiert Heparin als Cofaktor des Antithrombins II/III die Inaktivierung von Thrombin. Außerdem werden die Faktoren XII, XI, Xa, IX, VIII direkt und durch die Antithromboplastinwirkung die Faktoren V und II indirekt gehemmt (26,46).

Ferner besitzt injiziertes Heparin Klärwirkung auf lipämisches Plasma. Dieser Effekt wird auf die durch Heparin aus Gefäßendothel und Gewebe freigesetzte und aktivierte Lipoprotein-Lipase zurückgeführt. Der Komplex aus diesem Enzym und Heparin ist in der Lage, durch Triglyceridspaltung die Plasmakonzentration der Lipoproteinklassen LDL und VLDL zu senken, wobei die HDL-Konzentration zunimmt (22,26,46,7o). Während insbesondere die LDL einen atherogenen Effekt besitzen (14,36), wird für die HDL in jüngster Zeit eine Schutzwirkung diskutiert (9).

Pharmakokinetisch bedeutsam ist, daß Heparin, gelangt es in den Blutkreislauf, sich in kürzester Zeit entgegen dem Konzentrationsgradienten an die Endothelmembranen anlagert (41), woraus die kurze, dosisabhängige Halbwertszeit von 56 bis 152 Minuten nach i.v. Injektion resultiert (26). Direkte Messungen ergaben eine 1oo mal höhere Heparinkonzentration im Endothel als im Blut (41).

Bezüglich der antiproliferativen Wirkung von Heparin auf experimentell erzeugte Intimaproliferationen werden im wesentlichen folgende Theorien zum Mechanismus diskutiert (22,23,38,44); s. auch Abb. 1-3:

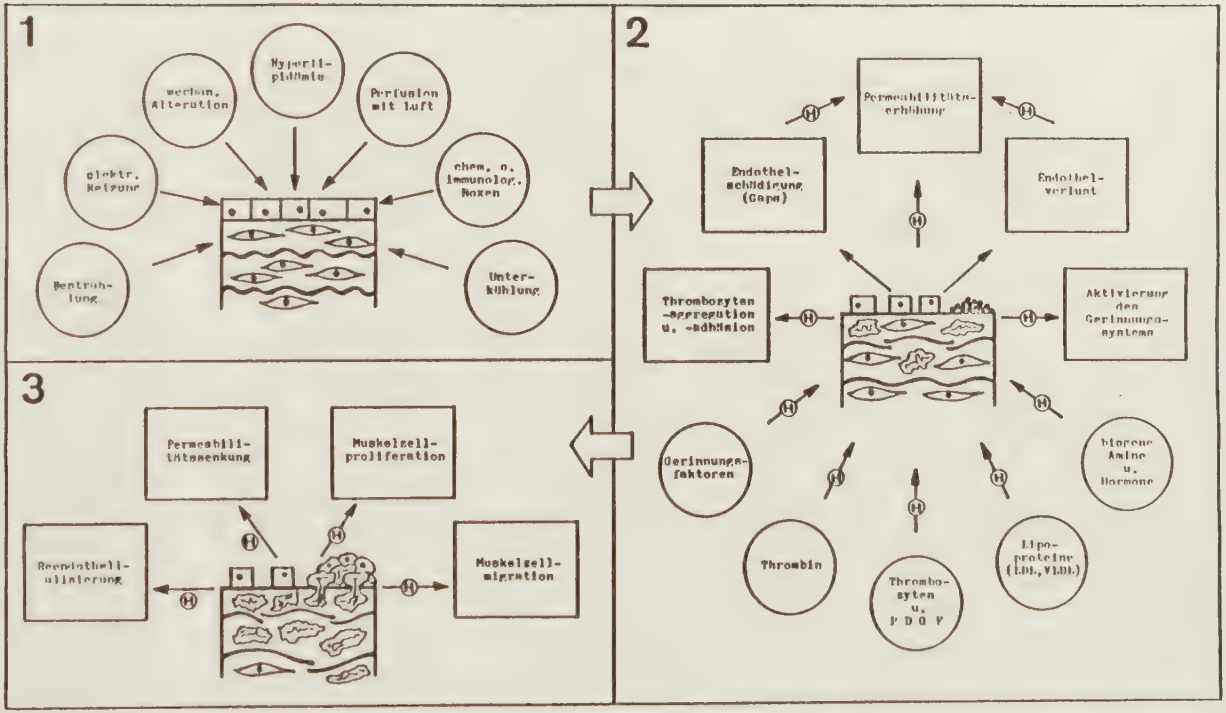

Abb. 1-5: Darstellung der möglichen Angriffspunkte von Heparin

= Endothelzelle = Muskelzelle = modifizierte Muskelzelle = Thrombozyten

= Heparin = fördernde Wirkung = hemmende Wirkung

= beeinflussende Faktoren

= Reaktion der Arterienwand

1. Antithrombotische Wirkung:
   a) Beeinflussung der Thrombozytenfunktion (incl. Inaktivierung des PDGF)
   b) Hemmung des hochmitogenen Thrombins
2. Einfluß auf den Fettstoffwechsel:
   a) Änderung des Lipoproteinmusters (s.o.)
   b) Verminderte Aufnahme von Serumlipoproteinen in die Endothelzelle und/oder Metabolisierung in der Zelle
3. Herabsetzung der Gefäßpermeabilität
4. Zelluläre Effekte:
   a) Unterstützung bzw. Stimulation der Endothelregeneration
   b) Direkte Wirkung auf die glatten Muskelzellen
   c) Zytoprotektive Wirkung auf die Endothelzellen

In der vorliegenden Arbeit wurde daher versucht, die Bedeutung der genannten Effekte von Heparin im Hinblick auf seine antiatherosklerotische Wirkung einzuschätzen.
Wir verwendeten ein experimentelles Thromboatherosklerosemodell, bei dem durch Kombination zweier Noxen - Unterkühlung eines Arterienabschnittes und cholesterinreiche Diät - atherosklerotische Frühstadien (Muskelzellproliferationen) bei Ratten induziert werden (73).

Die Frage nach einer möglichen Abhängigkeit der Heparinwirkung von einer hyperlipidämischen Diät sollte im Rahmen einer Dosis-Wirkungs-Beziehung untersucht werden.
Mit Hilfe des Indikators Evans Blue sollte die Gefäßpermeabilität gemessen und über einen Zeitraum von 3 Stunden bis 1o Tagen nach Schädigung der Arterie verfolgt werden.
Hierbei sollte nicht nur die Beeinflussung der Permeabilität durch Heparin untersucht werden, sondern auch Anhaltspunkte für die Beantwortung der Frage gewonnen werden, ob Heparin die Reendothelialisierung beschleunigt.
Ferner wurden das zeitliche Auftreten der Proliferation

und ihre Entwicklung bei unbehandelten und heparinisierten Tieren verglichen.
Da in bisherigen experimentellen Modellen Heparin während der gesamten Versuchszeit appliziert wurde (18,38, 71), stellte sich die Frage, in welchem Zeitraum im Anschluß an die Endothelschädigung Heparin seine Hauptwirkung entfaltet, ob es also primär initiale Mechanismen oder das Wachstum einer sich bildenden Intimaverdikkung beeinflußt. Die Beantwortung dieser Frage könnte Aufschluß darüber geben, inwieweit Regression bzw. Wachstumsstillstand atherosklerotischer Frühstadien mit einer Heparinbehandlung erzielt werden können. Daher wurden bei einer weiteren Untersuchung Applikationsbeginn und -dauer variiert.
Schließlich wurden morphologische Veränderungen im Bereich der Läsion licht- und elektronenmikroskopisch beobachtet. Von besonderem Interesse dabei war der mögliche Einfluß von Heparin auf Thrombozytenadhäsion, Auftreten von Fibrin und Migration glatter Muskelzellen.

2. METHODEN

2.1 Tiere

Die Versuche wurden an männlichen SPF-Ratten (SPF= specific pathogen free) vom Stamm Wistar mit einem durchschnittlichen Gewicht von 185 g durchgeführt.
Die Tiere verloren durch die Operation und die Umstellung auf die Fettdiät in den ersten Versuchstagen an Gewicht, erreichten jedoch nach 1o Tagen ca. 1o5 % des Ausgangsgewichtes.

2.2 Futter

Bis Versuchsbeginn erhielten die Tiere Normalfutter (Altromin^{R}) und wurden am Abend vor der Operation nüchtern gesetzt, behielten jedoch Wasser ad libitum. Während der Versuche wurden pro Tier 2o g/die einer Fettdiät verabreicht. Am Vorabend des letzten Versuchstages wurden die Tiere zur Bestimmung ihres Gewichtes nüchtern gesetzt (Ausnahme: Versuch 3.2).

Zusammensetzung

des Normalfutters:		der Fettdiät:	
Rohprotein	: 19 %	Cholesterin	: 3 %
Rohfett	: 4 %	Cholsäure	: 1 %
Rohfaser	: 6 %	Rohrzucker	: 34 %
Asche	: 7 %	Schweineschmalz	: 1o %
Wasser	: 13.5 %	Altromin^{R}	: 52 %
N-freie Extraktstoffe	: 5o.5 %		

Durch die Fettdiät steigen die Cholesterinwerte der Ratten auf 3oo - 4oo mg %, der Normalwert liegt bei 4o - 5o mg % (74).

2.3 Wirkstoff, Dosis und Applikation

Verwendet wurde ein Heparin-Natrium mit 15o ooo USP E/g (Fa. Danimex, Hamburg), das in steriler o.9 %-iger NaCl gelöst wurde. Mit Ausnahme von Versuch 3.1 (Dosis-Wirkungs-Beziehung) wurde Heparin stets in einer Dosierung von 1o mg/kg/die subcutan verabreicht, verteilt auf zwei Applikationen (2 x 5 mg/kg), morgens und abends in jeweils 1 ml/kg. Die Kontrollgruppen erhielten dieselbe Menge physiologische Kochsalzlösung. Die erste Applikation wurde 4 Stunden nach Operation vorgenommen, die letzte 1 Stunde, bei den Versuchen mit Evans Blue 2 Stunden vor Tötung.

2.4 Operations- und Unterkühlungstechnik

Die lokalen Intimaproliferationen wurden durch Unterkühlung eines Abschnittes der linken Arteria carotis communis erzeugt. Die Methode wurde ursprünglich zur Erzeugung von Thromben in venösen und arteriellen Gefäßabschnitten im Institut für Pharmakologie der Bayer AG entwickelt (53,54, 55,69) und dort später im Rahmen der Atheroskleroseforschung eingesetzt (73,75).
Bei den mit Äther narkotisierten Tieren wird ein ca. 2 cm langer medianer Hautschnitt im Bereich des vorderen Halses angelegt. Mit Hilfe von stumpfen Dentalhaken wird die Arterie nach schonender Durchtrennung der infrahyoidalen Muskulatur, zwischen Bifurkation und Sternum vorsichtig freipräpariert. Am proximalen Ende des freigelegten Abschnittes wird mit einer Dieffenbachklemme der Blutfluß unterbrochen. Die Arterie wird unter möglichst geringem Anheben in eine 26 mm über dem Präparationsbrett gelagerte Kühlrinne gelegt und von einem durch ein 2oo g - Gewicht beschwerten Plastikstempel über die gesamte Länge (1 cm) gleichmäßig angedrückt.
Die Kühlrinne befindet sich in einem Metallblock (1o mm breit, 5 mm hoch, 6o mm lang), durch den ein Kühlgemisch fließt,

das durch einen Kryo-Thermostaten (Typ Mc I, Fa. Colora) auf einer konstanten Temperatur von -1o° C gehalten wird. Vor jeder neuen Unterkühlung wird die Kühlrinne mit einem Wattestäbchen gesäubert. Nach genau 2 min wird die Arterie vorsichtig von der Kühlrinne gelöst. Der Blutfluß setzt unmittelbar nach Entfernen der Klemme wieder ein und die Arterie wird reinkorporiert. Die Wunde wird mit einem antibiotisch wirksamen Puder (Marfanil^{R} Prontalbin^{R}) versorgt und mit Klammern verschlossen.

2.5 Blutgewinnung und Präparation der Intimaproliferation

Bei Versuchsende wurden die Tiere mit Äther narkotisiert und die Aorta abdominalis freipräpariert. Nach Einführen eines Polyäthylen-Katheters (1.3 mm Ø) wurden die Ratten aus der Aorta entblutet.
Unmittelbar danach wurde wie unter 2.4 beschrieben die linke Arteria carotis communis präpariert, entnommen und auf ein mit o.9 %-iger Kochsalzlösung getränktes Korkbrett gelegt. Unter einer Stereolupe (Typ M 7, Fa. Wild-Heerbrugg) wurde die Arterie von anhaftenden Gewebeteilen gründlich gesäubert und mit einer Pinzettenschere in Längsrichtung aufgeschnitten. Durch die anschließende Sudan-IV-Fettfärbung wurde eine deutlichere Unterscheidung der Intimaproliferation von der übrigen Gefäßwand möglich. Mit Uhrmacherpinzetten wurden unter der Stereolupe die Proliferationen abpräpariert.

2.6 Sudan-IV-Färbung der Gefäßwand und Reextraktion des Farbstoffs

Die Färbelösung wurde aus 5o ml 5o %-igem Alkohol, 5o ml Aceton und 3oo mg Scharlachrot hergestellt, nach Auflösung des Farbstoffs filtriert und lichtgeschützt aufbewahrt. Die Arterienwände wurden nach zweiminütigem Eintauchen in 5o %-igem Alkohol 1o min in der Färbelösung belassen, dann in 5o %-igem

Alkohol und anschließend in Aqua dest. gespült. Die lipidhaltigen Bezirke färben sich dabei rot an (sudanophile Färbung).
Nach Abpräparation der Proliferation wurde mittels einer Tandem-Rasierklinge ein Abschnitt von genau 1 cm Länge aus dem Gefäß herausgeschnitten und gewogen (Elektrowaage Typ ME 3o, Fa. Mettler). Die Reextraktion des Farbstoffs erfolgte mit einem Gemisch aus 3 Teilen absolutem Alkohol und 2 Teilen Aceton. Die Gefäße wurden in jeweils o.5 ml dieses Gemisches in Eppendorf-Reaktionsgefäßen 2 Stunden belassen. Vor der photometrischen Messung (Spectrophotometer Typ 552, Fa. Perkin-Elmer) bei 358 nm gegen das Lösungsgemisch als Leerwert, wurde die Lösung 1 min zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge Typ 5412). Der Quotient aus Extinktion (Absorbtion) und Wandgewicht ist ein Maß für den Lipidgehalt der Arterienwand.

2.7 Bestimmung des Proliferationsgewichtes

Um das Ausmaß der Proliferation zu quantifizieren, wurde deren Feuchtgewicht bestimmt. Die Wägung erfolgte mit einer hochempfindlichen, rasch anzeigenden Elektrowaage (Typ ME 3o, Fa. Mettler) sofort im Anschluß an die Präparation.

2.8 Eiweißgehalt der Proliferation

Die Bestimmung wurde in modifizierter Form nach Lowry (5o) durchgeführt. Die Proliferationen wurden nach Bestimmung ihres Gewichtes einzeln in o.25 ml 1 n Natronlauge über Nacht aufgelöst. Der Ansatz aus o.2 ml Probe, 1.4 ml 1o %-igem Natriumcarbonat und o.2 ml o.1 %-igem Kupfersulfat wurde 3o min bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurde o.2 ml Phenol-Reagenz nach Folin-Ciocalteu (Fa. Sigma^{R} Chemical Company) hinzugefügt und der Ansatz 5 min bei 37^{o} C im Wasserbad inkubiert. Nach 15-minütigem Abkühlen erfolgte

die photometrische Messung bei 578 nm (Spectrophotometer Typ 552, Fa. Perkin-Elmer). Die Extinktion (Absorbtion) ist ein Maß für den Eiweißgehalt der Proliferation.

2.9 Bestimmung der Partiellen Thromboplastinzeit

Wie unter 2.5 beschrieben wurden 4.5 ml Blut nach Vorlegen von o.5 ml 3.8 %-iger Natriumcitratlösung in einem Plastikreagenzröhrchen aufgefangen und 1o min bei 3ooo U/min zentrifugiert. Von jeder Plasmaprobe wurde nach Zugabe eines PTT-Reagenzes (Behring-Institut) mit Hilfe eines Koagulometers (Typ 5/69, Fa. H. Amelung) eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Einzelwerte wurden gemittelt.

2.1o Permeabilitätsuntersuchung mit Evans Blue

Der Azofarbstoff Evans Blue ist seit langem ein vielverwendeter Indikator für lokale Permeabilitätsänderungen und Endothelläsionen der Gefäßwand (4,15,29,35,52,6o,72, 76,8o,85). Nach intravenöser Injektion bildet Evans Blue mit Plasmaproteinen Komplexe, deren gesteigerte Aufnahme in subendotheliale Bereiche Ausdruck einer erhöhten Permeabilität ist (52,6o). So lassen sich bereits makroskopisch intensiv blaugefärbte Läsionsstellen von nahezu ungefärbten, ungeschädigten Bezirken unterscheiden. Die photometrische Messung des mit Formamid reextrahierten Farbstoffs läßt eine Aussage über Permeabilitätsänderungen zu (15).
Den Tieren wurde 1 Stunde vor Exitus Evans Blue in einer Dosis von 2o mg/kg in 3 ml/kg steriler physiologischer Kochsalzlösung langsam in eine Schwanzvene injiziert. Die Arterien wurden wie unter 2.5 beschrieben reseziert und gesäubert. Mit Hilfe einer Tandem-Rasierklinge wurde ein Abschnitt von genau 1 cm Länge herausgeschnitten, wobei sich der angefärbte Bezirk (= unterkühlter Bereich) innerhalb dieses Abschnittes befand. Zur Reextraktion des Farb-

stoffs wurden die Arterien nach Aufschneiden in Längsrichtung 2 Stunden in Formamid (5oo µl) aufbewahrt. Die bei 623 nm gemessene Extinktion (Absorbtion) ist ein Maß für die reextrahierte Farbstoffmenge (Spectrophotometer Typ 552, Fa. Perkin-Elmer).

2.11 Bestimmung der Triglyceride im Plasma

Das Plasma wurde wie unter 2.5 und 2.9 beschrieben gewonnen. Die Werte wurden mit einem vollenzymatischen UV-Test mit Extinktionsabnahme (Testomar^{R} - Triglyceride, Behring-Institut) nach Bucolo und David bestimmt (1o). Als Meßgröße diente die bei 34o nm am Spectrophotometer (Typ 552, Fa. Perkin-Elmer) ermittelte Konzentrationsabnahme von $NADH_2$ bei der Umwandlung zu NAD.

2.12 Histologische Untersuchungen

2.12.1 Lichtmikroskopie

Nach Resektion wurden die Arterien mit physiologischer Kochsalzlösung durchspült, in drei gleichgroße Abschnitte geteilt und in Formalin fixiert. Nach Einbetten in Paraffin wurden 6 µ dicke Querschnitte angefertigt (Mikrotom Typ 113o Biocut^{R}, Fa. Rückert-Jung).
Neben der modifizierten Bindegewebsfärbung nach Masson wurden zur differenzierten Darstellung die Fibrinfärbung nach Fraser-Lendrum und die Oil-Red-O Fettfärbung verwendet (51).

2.12.2 Elektronenmikroskopie

Die herauspräparierten Gefäße wurden zunächst anfixiert (2 %-iges Glutardialdehyd in o.15 M Soerensen - Phosphatpuffer, ph 7.3, 36o mosm). Unter der Stereolupe wurde der Arterienabschnitt von anhaftendem Gewebe befreit, mit einer

Pinzettenschere längs aufgeschnitten und mit einer Rasierklinge in Stücke von o.5 - 1.o mm Kantenlänge zerteilt. Diese Objekte wurden bei Zimmertemperatur 4 Stunden fixiert, danach in Phosphatpuffer gewaschen und weitere 4 Stunden in einer 2 %-igen Osmiumtetroxidlösung nachfixiert. Es folgte die routinemäßige Entwässerung und Einbettung in Epon 812^{R}. Alle Objekte wurden auf LKB - Ultrotomen semidick (o.5 - 1.o µ) und anschließend mit Diamantmessern ultradünn (< 5oo Å) geschnitten. Die Dünnschnitte wurden mit Blei- und Uranylacetatlösungen doppelkontrastiert und mit einem Philips Elektronenmikroskop des Typs EM 4oo T^{R} untersucht.

2.13 Statistische Berechnungen

Die statistische Bearbeitung der ermittelten Werte und Ergebnisse erfolgte mit Hilfe eines Tischcomputers (Wang 6oo, Fa. Wang Laboratories GmbH) nach den für die statistischen Größen erforderlichen Programmen. Der Computer wurde nach folgenden Formeln programmiert:

$$\text{Streuung des Mittelwerts} = s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n\,(n - 1)}}$$

$$\text{Regressionskoeffizient} = b_{yx} = \frac{\sum (x - \bar{x})\,(y - \bar{y})}{\sum (x - \bar{x})^2}$$

Korrelationskoeffizient $= r = \dfrac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}}$

t - Wert (Student-verteilung) $= \dfrac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\dfrac{\sum (x_1 - \bar{x}_1)^2 + \sum (x_2 - \bar{x}_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}}} \cdot \sqrt{\dfrac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$

Der p-Wert wurde anhand der Tabelle (Documenta Geigy, 7. Aufl.) für Signifikanzschranken der Studentverteilung ermittelt (2 p; $n_1 + n_2 - 2$).

In den Formeln bedeuten:

x = Einzelwert (1. Merkmal)
y = Einzelwert (2. Merkmal)
x_1 = Einzelwert der Kontrollgruppe
x_2 = Einzelwert der Vergleichsgruppe
n = Anzahl der Einzelwerte
$\bar{x}$; $\bar{y}$ = Mittelwerte

3. V E R S U C H S D U R C H F Ü H R U N G U N D E R G E B N I S S E

3.1 Antiproliferative, dosisabhängige Wirksamkeit von Heparin

Zur Überprüfung der dosisabhängigen Wirkung von Heparin auf experimentell induzierte Intimaproliferationen im im Rahmen der verwendeten Unterkühlungstechnik wurde ein Kollektiv von 8o Ratten mit einem Gewicht zwischen 16o g und 19o g operiert und in Gruppen zu je 1o Tieren aufgeteilt. Die Behandlung erfolgte mit Heparin in den Dosen 1.o, 3.o und 1o.o mg/kg/die s.c. bzw. mit physiologischer Kochsalzlösung. Während des Versuchs erhielt die Hälfte der Tiere an Stelle des cholesterinreichen Fettfutters die gleiche Menge Normalfutter (Altromin^{R}), um zu prüfen, ob das Ausmaß der Proliferation bzw. der Effekt von Heparin einer Beeinflussung durch die Fettdiät unterliegen. Nach 1o Tagen wurden die Ratten getötet. Die Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit ergab in beiden Futtergruppen eine dosisabhängige, prozentuale Verlängerung (Tab. 1), die bei den Gruppen mit der niedrigsten Dosis unter 6 % liegt. Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant. Bei der mittleren und höchsten Dosis zeigten sich im Vergleich zur Kontrolle Verlängerungen von 31.7/ 2o.4 % bzw. 181.9/217.4 % (Fettdiät/Normalfutter). Die statistische Signifikanz liegt für alle 4 Gruppen bei $p < o.oo1$ vs. Ko. Nach Resektion der geschädigten Arterien wurden zwei Gefäße pro Gruppe zur Anfertigung histologischer Präparate fixiert. Bei den verbleibenden 64 Arterien wurden die Proliferationen abpräpariert und gewogen. Zusätzlich wurde bei 4 Proliferationen aus jeder Gruppe eine Eiweißbestimmung durchgeführt. Die signifikante Korrelation zwischen Eiweißgehalt und Feuchtgewicht ($r = o.94$, $p < o.oo1$) weist darauf hin, daß das Gewicht als zuverlässiges Maß für die Größe der Proliferation angesehen werden kann (Abb. 4). Daher wurde bei den weiteren Versuchen auf eine Eiweißbestimmung verzichtet.

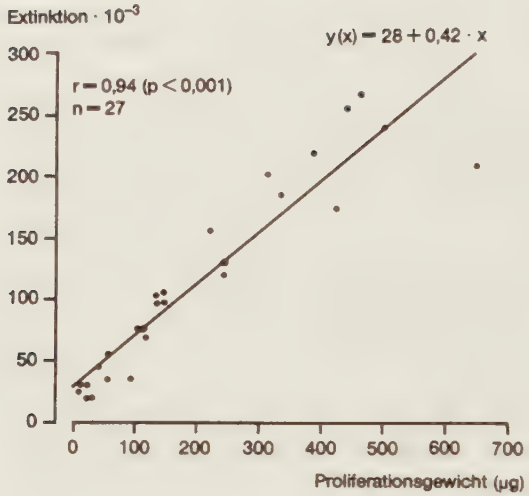

Abb. 4: Korrelation zwischen Eiweißgehalt (Extinktion) und Feuchtgewicht der Proliferationen. r = Korrelationskoeffizient.

Die photometrische Messung der reextrahierten Farbstoffmenge aus den nach Sudan IV gefärbten Arterien ergab (Tab. 2), daß die geschädigten Gefäßabschnitte bei fettgefütterten Ratten wesentlich mehr sudanophile Lipide enthalten als bei Tieren, die Normalfutter erhielten. Zwischen den beiden Kontrollgruppen ($p < 0.001$) und den Dosisgruppen 2 x 1.5 mg/kg ($p < 0.05$) und 2 x 5.0 mg/kg ($p < 0.025$) sind die Unterschiede bezüglich Fett- und Normalfutter signifikant. Dies trifft für die Gruppen mit der niedrigsten Dosis nicht zu. Demgegenüber besteht innerhalb der Fettdiätgruppe bei allen Dosierungen in Bezug auf die Kontrollgruppe keine signifikante

Änderung des Lipidgehalts. Dies gilt bis auf eine Ausnahme (Dosis 2 x 1.5 mg/kg vs. Ko.: $p < 0.05$) auch für das Kollektiv der normalgefütterten Tiere. Es ist somit kein Einfluß von Heparin auf die Einlagerung sudanophiler Lipide im Bereich der Läsionsstelle erkennbar.

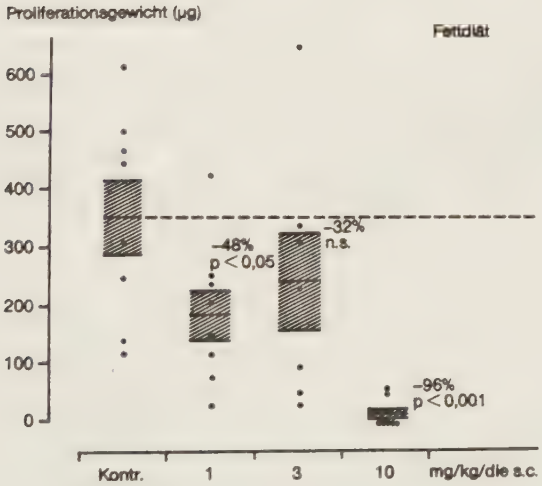

Abb. 5: Antiproliferativer Effekt von s.c. appliziertem Heparin über 1o Tage nach experimentell erzeugter Proliferation (Ratte, li. A. carotis) bei Fettdiät. Angegeben sind die Einzelwerte, prozentuale Hemmung und Signifikanz. n.s. = nicht signifikant

Das Proliferationsgewicht in den Kontrollgruppen beträgt im Mittel 355 µg bei Fettdiät und 244 µg bei Normalfutter (Abb. 5 und 6, Tab. 1). Die Unterschiede liegen im Rahmen der methodisch bedingten Streuung und sind statistisch

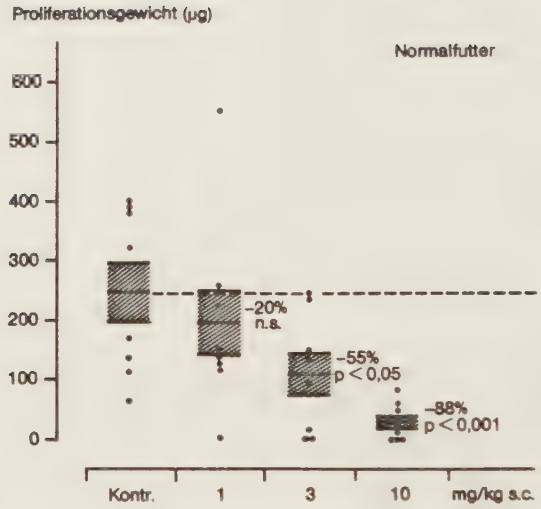

Abb. 6: Antiproliferativer Effekt von s.c. appliziertem Heparin über 1o Tage nach experimentell erzeugter Proliferation (Ratte, li. A. carotis) bei Normalfutter. Angegeben sind die Einzelwerte, prozentuale Hemmung und Signifikanz. n.s. = nicht signifikant

nicht signifikant. Bei der niedrigsten Dosis zeigt sich eine Hemmung von 48 % (Fettdiät, $p < o.o5$) bzw. 2o % (Normalfutter, n.s.) und bei der mittleren Dosis eine Hemmung von 32 % (Fettdiät, n.s.) bzw. 55 % (Normalfutter, $p < o.o5$). Ein deutlicher Effekt (88 % bzw. 96 %) mit einem hohen Maß an statistischer Zuverlässigkeit ($p < o.oo1$) wird jedoch erst mit einer Dosis von 1o mg/kg/die subcutan erreicht. Neben der Reduktion des Proliferationsgewichtes gegenüber den Kontrollgruppen, weisen bei dieser Dosierung die Hälfte der

Arterien keine Proliferationen auf (Abb. 5 und 6). Ferner läßt sich statistisch kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gleicher Dosis jedoch verschiedener Diät feststellen.

3.2 Operationsbedingte Permeabilitätsänderung, zeitlicher Verlauf und Beeinflussung durch Heparin

Eine Voruntersuchung sollte zunächst die Einlagerung des Farbstoffs in die ungeschädigte Gefäßwand bei unbehandelten und heparinisierten Tieren prüfen. Tabelle 3 zeigt die Werte der photometrischen Messung, wobei die Extinktion ein Maß für die eingelagerte Farbstoffmenge darstellt. Neben der geringen Streuung der Einzelwerte ist ersichtlich, daß kein Unterschied zwischen beiden Gruppen besteht (Kontrolle: o.o34; Heparin: o.o32; $p > o.6$). Es läßt sich somit kein Einfluß von Heparin auf die Permeabilität der ungeschädigten Intima nachweisen.

Die durch die Schädigung der Arteria carotis möglicherweise hervorgerufene Erhöhung der Permeabilität und deren Beeinflußbarkeit durch Heparin wurde 3 und 6 Stunden nach Unterkühlung untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 aufgeführt und zeigen bei allen Tieren eine beträchtliche Steigerung der Permeabilität im Vergleich zur Voruntersuchung. Die Extinktion beträgt in den Kontrollgruppen nach 3 Stunden o.178 und nach 6 Stunden o.176. Eine unerwartet hohe, gegenüber den Kontrolltieren signifikant vermehrte Durchlässigkeit der Gefäßwand wurde in den Heparingruppen festgestellt: $E = o.224$ (3 Stdn., $p < o.o1$) bzw. $E = o.21o$ (6 Stdn., $p < o.o5$).

An einem größeren Kollektiv wurde die Entwicklung der genannten Veränderungen über einen Zeitraum von 1o Tagen verfolgt, in dem am 1., 2., 4., 6., 8. und 1o. Tag die geschädigten Arterien reseziert und untersucht wurden. Der bei den Stundenwerten beobachtete Unterschied zwischen Kontroll- und Heparingruppen ist nach einem Tag statistisch nicht mehr objektivierbar (Abb. 7).

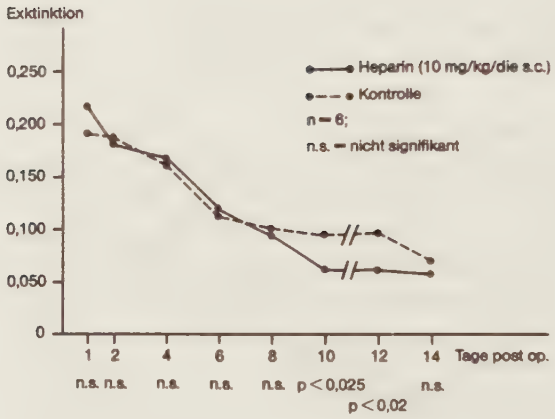

Abb. 7: Permeabilitätsänderung im geschädigten Bereich 1 - 14 Tage nach Unterkühlung (Ratte, li. A. carotis) bei heparinisierten und unbehandelten Tieren. Photometrische Messung (Extinktion) des reextrahierten Farbstoffs Evans Blue.

Jedoch liegt die Extinktion ebenfalls in einem Bereich von o.2oo und weist somit auf die immer noch stark erhöhte Permeabilität hin, die in den darauffolgenden Versuchstagen kontinuierlich und mit vernachlässigbaren Unterschieden zwischen beiden Gruppen abnimmt und am 8. Tag einen Extinktionswert von ca. o.o95 erreicht. Während die Permeabilität im Bereich des geschädigten Gefäßabschnittes bei den mit Heparin behandelten Tieren sich bis zum 1o. Tag weiter verringert (E = o.o62), ist für die Kontrollgruppe im Vergleich zum 8. Tag keine Abnahme festzustellen.

Da es sich hierbei um einen signifikanten Unterschied handelt ($p < 0.025$), wurde die Entwicklung über den 1o. Tag hinaus an einem zusätzlichen Versuchskollektiv verfolgt. Die hierbei erzielten Ergebnisse für den 12. und 14. Tag zeigen (Abb. 7), daß sich die am 1o. Tag beobachtete Differenz zwischen beiden Gruppen fortsetzt, am 14. Tag jedoch nicht signifikant ist. Trotz der erwähnten abnehmenden Tendenz vom 1. bis zum 8. bzw. 1o. Tag sinkt die Permeabilität nicht auf das in der Voruntersuchung ermittelte Niveau.

Vor der Reextraktion des Farbstoffs konnten die in Längsrichtung aufgeschnittenen Gefäße und insbesondere die geschädigten Bezirke mit Hilfe einer Stereolupe betrachtet werden. Bei den Arterien die 3 und 6 Stunden nach der Operation reseziert wurden ist der unterkühlte Bereich durch eine intensiv blaue Färbung von den fast weißen ungeschädigten Abschnitten nahezu geradlinig abgegrenzt. In den darauffolgenden Tagen werden die proximalen und distalen Ränder der Läsion zunehmend unschärfer, wobei sich die Größe der blau gefärbten Fläche verringert. Auftretende Proliferationen liegen vornehmlich im zentralen Bereich der Schädigung, sind oft unregelmäßig begrenzt und treten häufig an verschiedenen Stellen gleichzeitig auf. Mit Ausnahme der Entwicklung von Proliferationen lassen sich zwischen den Gefäßen heparinisierter und unbehandelter Tiere keine Unterschiede feststellen.
Zur Anfertigung histologischer Präparate wurde zu den genannten Zeitpunkten nach Unterkühlung der Arteria carotis, ausgenommen am 12. und 14. Tag, 32 Tieren kein Evans Blue injiziert, sondern lediglich das Gefäß entnommen und fixiert (s. 3.6).

3.3 Entwicklung der Proliferation bis zum 1o. Tag

Die Beurteilung der histologischen Präparate ergab, daß vor dem 5. Tag nach Unterkühlung des Gefäßes keine lichtmikroskopisch erkennbaren Intimaverdickungen auftreten. Dies ließ vermuten, daß erst am 6. Tag Präparation und Gewichtsbestimmung der Proliferation durchführbar sind. Von diesem Zeitpunkt an wurde die Entwicklung des Proliferationsgewichts bei unbehandelten und heparinisierten Tieren durch Messungen am 6., 8. und 1o. Tag untersucht.

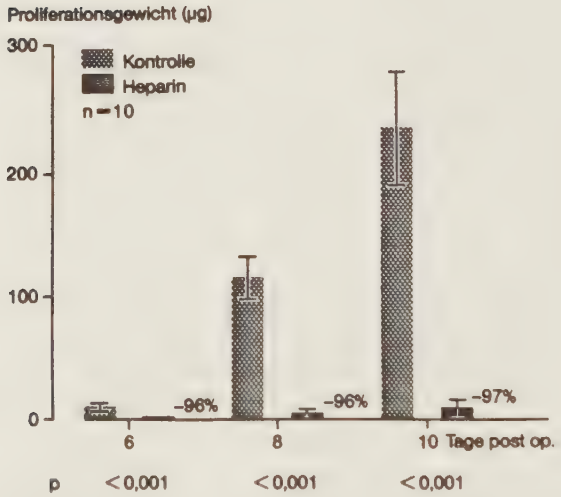

Abb. 8: Entwicklung der Proliferation bei unbehandelten und heparinisierten (2 x 5 mg/kg/die s.c.) Tieren, 6, 8 und 1o Tage nach Unterkühlung (Ratte, li. A. carotis). Angegeben sind die Mittelwerte, Streuung ($s_{\bar{x}}$), prozentuale Hemmung und Signifikanz.

Die Ergebnisse bestätigen die Annahme, daß innerhalb der zweiten Versuchshälfte die Proliferation einen wesentlichen Größenzuwachs erfährt. Dabei erreicht das Gewicht am 1o. Tag (236 µg) mehr als das zwanzigfache des am 6. Tag (1o µg) ermittelten Wertes. Am 8. Tag beträgt das Proliferationsgewicht 95 µg (Abb. 8, Tab. 5). Bei den mit Heparin behandelten Tieren zeigt sich zu allen drei Zeitpunkten eine Hemmung der Proliferation von ca. 96 %. Ferner ist bemerkenswert, daß in allen drei Heparingruppen jeweils bei 8 von 1o Tieren keine Intimaverdickung beobachtet wurde (Tab. 5).

3.4 Untersuchung der Wirksamkeit von Heparin bei Variation von Applikationsbeginn und -dauer

Mit den beiden folgenden Untersuchungen sollte geklärt werden, ob eine direkt postoperativ einsetzende und über die gesamte Versuchsdauer durchgeführte Applikation von Heparin Voraussetzung für die antiproliferative Wirkung ist, ferner inwieweit eine Regression bereits entstandener Proliferationen mit einer in der Versuchsmitte beginnenden Heparinbehandlung erzielt werden kann. Die Versuchsdauer betrug bei der ersten Untersuchung 1o Tage, bei der zweiten 2o Tage. In den Abbildungen 9 und 11 sind das Applikationsschema und die Gruppeneinteilung (A - E bzw. F - K) dargestellt.

3.4.1 Untersuchung nach 1o Tagen

Die Ergebnisse zeigen erneut eine deutliche Hemmung der Proliferation von 98 % ($p < o.oo1$) gegenüber der Kontrollgruppe durch Heparinbehandlung über 1o Tage. Der Kontrollwert liegt bei 277 µg, der Heparinwert bei 5 µg (Abb. 1o: D, Tab. 6). Erstaunlicherweise läßt sich bei einer postoperativen Kurzbehandlung ein ebenfalls stark antiproliferativer Effekt von Heparin nachweisen. So wird durch eine fünftägige Behandlung (C) eine Hemmung von 93 % (2o µg, $p < o.oo1$) erzielt, die nur um 5 % unter dem Ergebnis liegt, das durch die Dauerbehandlung erreicht wird. Darüberhinaus zeigt sich, daß selbst

eine dreimalige Injektion über anderthalb Tage ausreicht, eine hochsignifikante (55 µg, $p < 0.001$) Hemmung von 80 % zu erzielen und bei 4 Tieren ($n = 10$) das Auftreten einer erfaßbaren Intimaproliferation zu verhindern (B).
Im Gegensatz dazu führt eine erst am 6. Tag nach Läsion der Gefäßwand einsetzende Behandlung lediglich zu einer 50 %-igen Reduktion des Proliferationsgewichts gegenüber der Kontrollgruppe (140 µg, $p < 0.05$), wobei nur in einem Fall die Proliferation vollständig unterdrückt wurde (E).

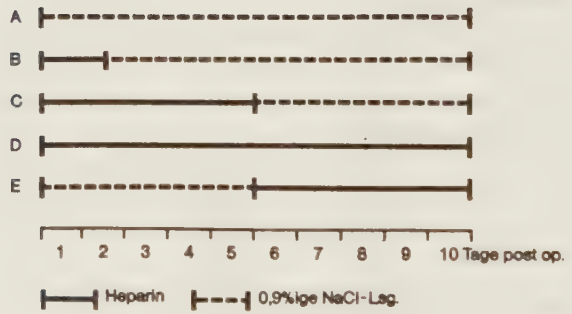

Abb. 9: Applikationsschema und Gruppeneinteilung (A - E) zu 3.4.1, Heparindosis: 2 x 5 mg/kg/die s.c.

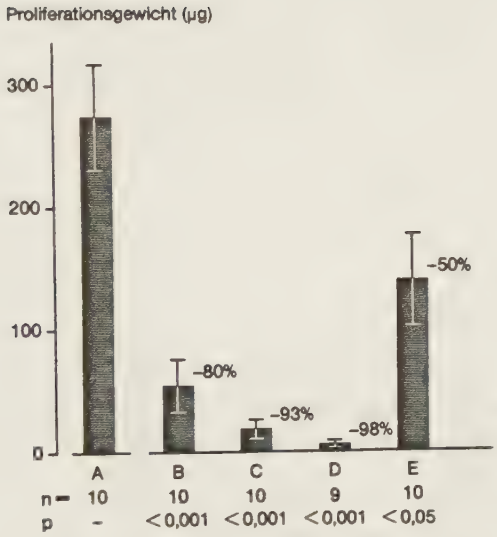

Abb. 1o: Effekt von Heparin (2 x 5 mg/kg/die s.c.) bei Variation von Applikationsbeginn und -dauer (s.o. Abb. 9) auf experimentell erzeugte Intimaproliferationen (Ratte, li. A. carotis). Angegeben sind die Mittelwerte, Streuung ($s_{\bar{x}}$), prozentuale Hemmung und Signifikanz; A = Kontrolle.

3.4.2 Untersuchung nach 2o Tagen

Da bei Gruppe E (Abb. 1o, Tab. 6) ein deutlicher Effekt von Heparin vorliegt, stellte sich die Frage, inwieweit Heparin eine Regressionswirkung besitzt. Daher wurde bei der folgenden Untersuchung das in Abbildung 11 dargestellte Applikationsschema angewandt. Die Kontrollgruppe F dient als Bezugsgröße für das mittlere Proliferationsgewicht am 1o. Tag, an dem zur Überprüfung der fraglichen Regression die Heparin-

behandlung von Gruppe K einsetzt. Wiederum wurde eine postoperative Kurzbehandlung von anderthalb Tagen (H) und eine Heparinapplikation während der ersten Hälfte (I), sowie über die gesamte Versuchsdauer (J) durchgeführt. Bei Versuchsende wurde zusätzlich der Triglyceridspiegel im Plasma ermittelt.

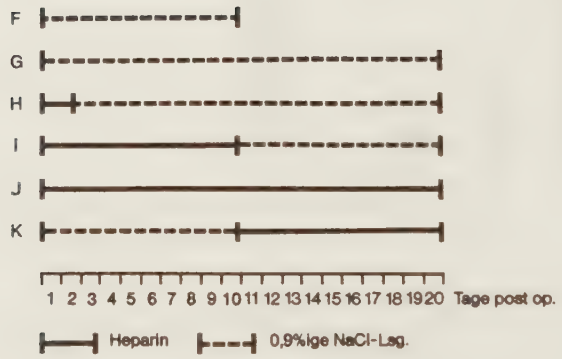

Abb. 11: Applikationsschema und Gruppeneinteilung (F - K) zu 3.4.2, Heparindosis: 2 x 5 mg/kg/die s.c.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 und in Abbildung 12 dargestellt. Zunächst ist festzustellen, daß das mittlere Proliferationsgewicht zur Versuchsmitte (F) von 276 µg sich nur unwesentlich von dem Ergebnis der Kontrollgruppe A (277 µg) aus der ersten Untersuchung unterscheidet. Das nach 2o Tagen ermittelte Proliferationsgewicht bei den unbehandelten

Tieren (G) liegt bei 645 µg, was einem Zuwachs von 234 % gegenüber 1o Tagen entspricht ($p < o.o2$). Ein ähnlich starkes Proliferationswachstum wurde bei den erst ab dem 11. Tag mit Heparin behandelten Tieren beobachtet (K). In dieser Gruppe liegen nur zwei Werte unter 6oo µg, der Mittelwert beträgt 623 µg. Es läßt sich kein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle feststellen.

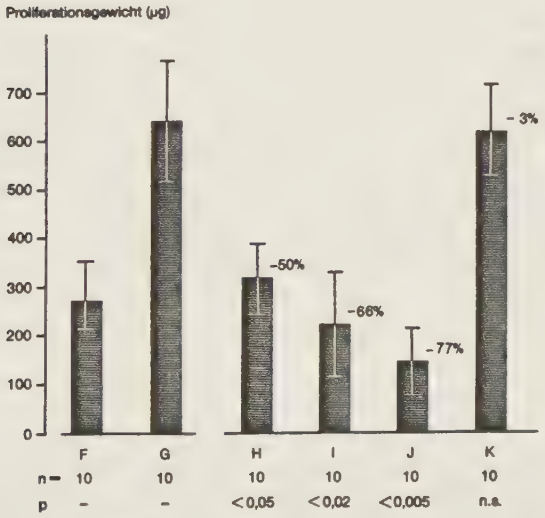

Abb. 12: Effekt von Heparin (2 x 5 mg/kg/die s.c.) bei Variation von Applikationsbeginn und -dauer (s.o. Abb. 11) auf experimentell erzeugte Intimaproliferationen (Ratte, li. A. carotis). Angegeben sind die Mittelwerte, Streuung ($s_{\bar{x}}$), prozentuale Hemmung und Signifikanz; G = Kontrolle, F = Proliferationsgewicht Versuchsmitte.

Im Gegensatz dazu liegt bei allen Tieren, die direkt nach Unterkühlung der Arteria carotis mit Heparin behandelt wurden (H, I, J) eine deutliche Hemmung vor. So wird das Wachstum der Proliferation selbst durch eine dreifache Applikation über die ersten anderthalb Tage um 5o % (322 µg, $p < 0.05$), bei der Heparinbehandlung bis Versuchsmitte um 66 % (223 µg, $p < 0.02$) und bei durchgehender Applikation um 77 % (148 µg, $p < 0.005$) jeweils signifikant gehemmt. In dieser Gruppe (J) liegen sieben Werte unter 8o µg, bei drei Arterien wurde keine Intimaproliferation beobachtet.

Die Ergebnisse der Triglyceridbestimmung nach Tötung der Tiere sind in Tabelle 8 aufgeführt. Der normale Triglyceridspiegel von Ratten liegt bei 2o - 3o mg/dl (74). Unter dem Einfluß der verwendeten Fettdiät ist sowohl bei den Kontrolltieren (F, G), als auch bei den nicht bis Versuchsende behandelten Tieren (H, I) eine starke Erhöhung zu beobachten. Die Mittelwerte der genannten Gruppen liegen zwischen 75 und 87 mg/dl. Die bis zum Zeitpunkt der Plasmagewinnung heparinisierten Ratten (J, K) zeigen einen normalen Spiegel von 3o bzw. 27 mg/dl.

3.5 Histologische Untersuchungen

Zur lichtmikroskopischen Beurteilung der nach Unterkühlung des Arterienabschnitts auftretenden Veränderungen wurden nach Ablauf unterschiedlicher postoperativer Zeitintervalle (3 und 6 Stunden, 1, 2, 4, 6, 8 und 1o Tage) bei 32 Tieren die geschädigten Carotiden zur Anfertigung histologischer Präparate reseziert. So konnten zu jedem Intervall 2 Arterien von Kontrolltieren und 2 Arterien von heparinisierten Tieren (Dosis: 2 x 5 mg/kg die s.c.) miteinander verglichen und der Verlauf der Veränderungen beobachtet werden.
Wie unter 3.1 erwähnt, wurden weitere 16 Arterienpräparate (n = 2) von Kontrolltieren bzw. heparinisierten Tieren angefertigt (3 verschiedene Dosen: Fettdiät/Normalfutter). Die Gefäße wurden bei Versuchsende reseziert (1o. Tag).

Zusätzlich wurden 8 Arterienpräparate (n = 2) für elektronenmikroskopische Untersuchungen hergestellt. Die Resektion dieser Gefäße erfolgte 4 Stunden bzw. 5 Tage nach Schädigung der Arterie.

3.5.1 Lichtmikroskopische Ergebnisse

Die Arterien unbehandelter und heparinisierter Tiere weisen 3 und 6 Stunden nach der Unterkühlung die gleichen, charakteristischen Veränderungen auf. Mit Ausnahme der proximalen und distalen Bereiche sind die Gefäßabschnitte vollständig deendothelialisiert (Abb. 13).

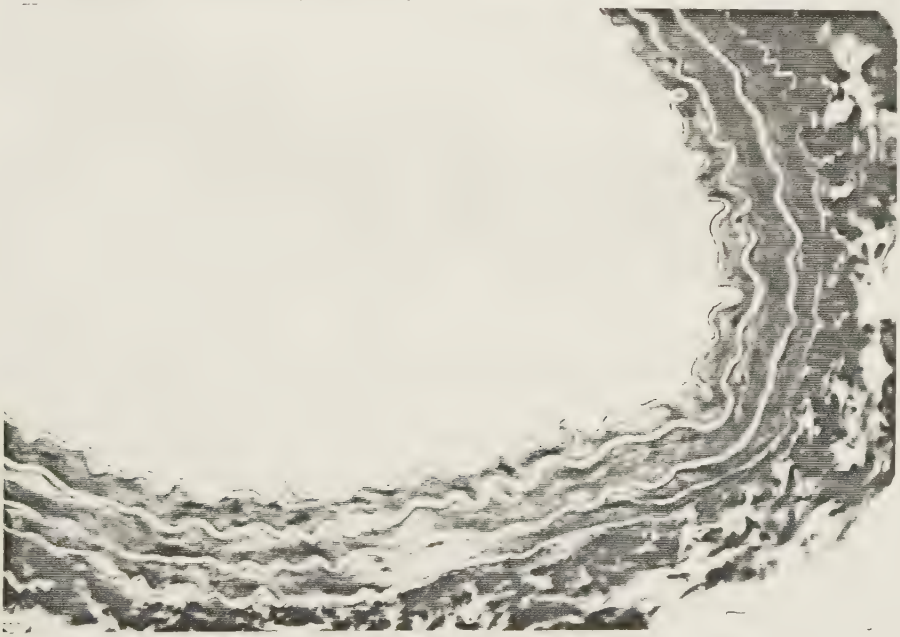

Abb. 13: Arteria carotis eines Kontrolltieres, 3 Stunden nach Unterkühlung; Färbg. Fraser-Lendrum, Vergr. 360 x. Endothelzellkerne fehlen völlig, die Zahl der angefärbten Muskelzellkerne ist vermindert; Thrombozyten oder Fibrin sind nicht zu erkennen.

Dennoch lassen sich weder dichte Thrombozytenteppiche noch Fibrinablagerungen feststellen. Letztere wären durch die verwendete Fraser-Lendrum-Färbung sichtbar gemacht worden. Stellenweise sind jedoch kleine, wandadhärente Aggregate von Thrombozyten erkennbar. Ferner ist bemerkenswert, daß in der Media im Vergleich zu einer ungeschädigten Arterie die Anzahl der ungefärbten Muskelzellkerne stark verringert ist und die elastischen Lamellen stärker aufgesplittert erscheinen (Abb. 13).

Überraschenderweise ändern sich diese Befunde erst bei den Gefäßpräparaten vom 4. bzw. 6. postoperativen Tag.

Präparate von Kontrolltieren:
Bei einer Arterie finden sich bereits am 4. postoperativen Tag stellenweise auf der luminalen, deendothelialisierten Grenzfläche Zellen, die vermutlich den Beginn muskulofibröser Plaques darstellen, die sich bei den Präparaten vom 6. Tag eindeutig nachweisen lassen. Hier bestehen diese Proliferationen aus einer bis zu fünfschichtigen Lage rundlich-ovaler Zellen, zwischen denen wenig Bindegewebsstrukturen zu erkennen sind. Betrachtet man die Querschnitte nacheinander über die gesamte Länge der Arterienpräparate, so zeigt sich, daß die Proliferationen unregelmäßig an verschiedenen Stellen auftreten, meist eine zunächst zunehmende, dann abnehmende Tendenz in der Dicke aufweisen und immer nur einen kleinen Teil (bis zu 1/3) der luminalen Grenzfläche einnehmen. Bei den Präparaten vom 8. postoperativen Tag zeigen die qualitativ nicht veränderten Proliferationen eine Zunahme in der Dicke, und zwar bis zu ca. 1o Zellagen. Ferner weisen die Querschnitte häufiger Proliferationen auf als zuvor, und die luminale Grenzfläche ist oft über die Hälfte mit Proliferationszellen bedeckt. Nach 1o Tagen erreichen die Plaques mit über 1o Zellagen die ein- bis dreifache Dicke der Media und kleiden nicht selten den gesamten Querschnitt des Gefäßes aus (Abb. 14).

Ferner konnten bei vielen Querschnitten vom 4. postoperativen

Tag an wieder Endothelzellen beobachtet werden, die auf der Lamina elastica interna an proliferationsfreien Stellen liegen. Ihre Anzahl ist bei den Präparaten vom 1o. Tag deutlich vermehrt.

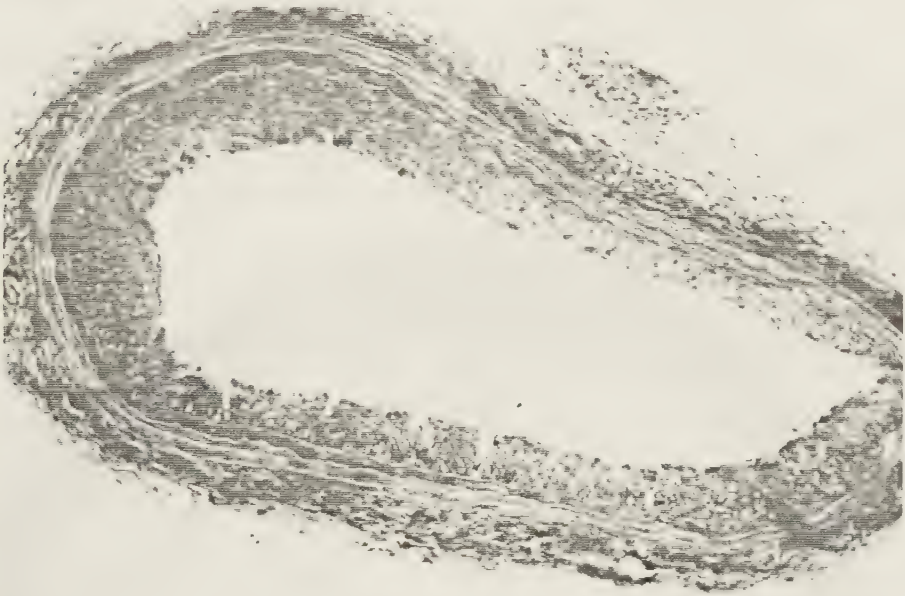

Abb. 14: Arteria carotis eines Kontrolltieres, 1o Tage nach Unterkühlung; Färbg. Fraser-Lendrum, Vergr. 18o x. Der gesamte Querschnitt der Arterie ist von einer Intimaproliferation ausgekleidet, die stellenweise über 1o Zellschichten aufweist. Sowohl in der Media als auch in der Proliferation sind Fettvakuolen erkennbar.

Präparate von heparinisierten Tieren:
Grundsätzlich lassen sich im Vergleich zu den Kontrolltieren keine Unterschiede feststellen. Dies gilt sowohl für den Endothelverlust, die Reendothelialisierung, das Auftreten wandständiger, kleiner thrombozytärer Aggregate, als auch für die Struktur hier ebenfalls festellbarer Proliferationen. Bis auf eine Arterie (8. p.op. Tag), bei der eine ähnlich massive Pro-

liferation wie bei den Kontrolltieren zu erkennen ist, ist jedoch das Ausmaß der atherosklerotischen Plaques wesentlich vermindert, wobei nur stellenweise eine Dicke von 4 Zellagen zu beobachten ist.

Die aus dem Versuch zur Dosis-Wirkungs-Beziehung (3.1) hervorgegangenen Arterienpräparate (1o Tage p.op. reseziert) sind hauptsächlich nach der Fraser-Lendrum-Methode, einige Querschnitte nach der Oil-Red-O-Methode gefärbt worden.
Die Präparate der Kontrolltiere entsprechen den schon erwähnten Beobachtungen.

Abb. 15: Arteria carotis eines heparinisierten Tieres, 1o Tage nach Unterkühlung; Färbg. Fraser-Lendrum, Vergr. 18o x. Es besteht kein Anhalt für eine Muskelzellproliferation, stellenweise sind Endothelzellkerne erkennbar.

Die Arterien der mit den beiden niedrigen Heparindosen behandelten Ratten (2 x o.5 bzw. 2 x 1.5 mg/kg/die s.c.) lassen

keine Unterschiede zu den Kontrollen erkennen. In der Gruppe mit der höchsten Dosis (2 x 5 mg/kg/die s.c.) wurden bei zwei Gefäßen die Proliferationen vollständig unterdrückt (Abb. 15), bei den beiden anderen Arterien wurden kleine, nur stellenweise vorhandene Proliferationen festgestellt, die 2 bis 4 Zellagen aufweisen und nur vereinzelt bis zur Hälfte die luminale Grenzfläche auskleiden.

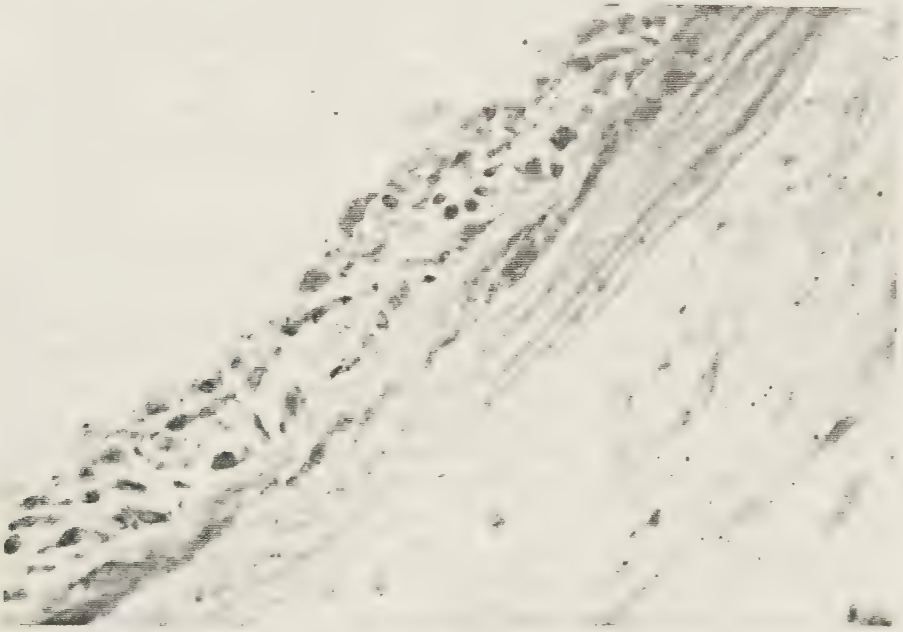

Abb. 16: Arteria carotis eines Kontrolltieres, 1o Tage nach Unterkühlung; Färbg. Oil-Red-O, Vergr. 72o x. Fettablagerungen sind sowohl in der Proliferation als auch in den oberen Schichten der Media deutlich zu erkennen.

Bei den Präparaten mit Oil-Red-O-Färbung lassen sich in der Fettdiätgruppe deutliche Lipidablagerungen nachweisen. Während sich Fett im Bereich der Proliferation vorwiegend intrazellulär befindet (Schaumzellen), scheint es in der Media extrazellulär zu liegen (Abb. 16). Ein Einfluß der Heparinbehandlung auf die Lipidablagerungen ist nicht zu erkennen. Auch bei den

Tieren, die Normalfutter erhielten, läßt sich gelegentlich Fett sowohl im Bereich der Proliferation als auch in der Media nachweisen. Jedoch sind diese Ablagerungen von weitaus kleinerem Umfang.

In Anbetracht der beobachteten vollständigen Deendothelialisierung der Gefäßwand durch die Unterkühlung, sei erwähnt, daß bei einer Voruntersuchung mit modifizierter Operationstechnik, die lichtmikroskopisch untersuchten Präparate nur eine geringe Deendothelialisierung aufwiesen. Wesentlich dabei ist, daß nur bei wenigen Tieren Proliferationen auftraten, deren am 1o. Tag ermitteltes Gewicht äußerst gering war.

3.5.2 Elektronenmikroskopische Ergebnisse

Die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen unterstützen und ergänzen im wesentlichen die lichtmikroskopischen Befunde.
Abbildung 17 zeigt den luminalen Bereich einer ungeschädigten Arteria carotis der Ratte. Endothelzellen haften mit pseudopodienartigen Ausläufern auf der Lamina elastica interna. In der obersten Schicht der Media sind länglich-ovale Myozyten deutlich zu erkennen.
Im Gegensatz dazu sind bei allen operierten Tieren die untersuchten Gefäßabschnitte 4 Stunden nach Unterkühlung vollständig deendothelialisiert (Abb. 18, 19, 2o, 21). Sowohl bei heparinisierten als auch bei Kontrolltieren zeigt sich eine ein- bis dreischichtige Lage von teilweise vollständig degranulierten Thrombozyten, die mit pseudopodienartigen Ausläufern fest an der Gefäßwand haften (Abb. 18, 19, 2o). Diese Thrombozytenadhäsion ist nicht an allen untersuchten Stellen nachweisbar, vereinzelt lassen sich jedoch auch größere Aggregate beobachten (Abb. 21). Fibrinablagerungen stellen sich unabhängig von der Behandlung überwiegend in Kontakt mit diesen größeren Ansammlungen von Thrombozyten dar. Die glatten Muskelzellen der innersten Mediaschichten sind teilweise stark geschwollen und lassen Anzeichen einer Schädigung erkennen (Abb. 18).

Auch nach 5 Tagen lassen sich bei allen Tieren flache adhärente Thrombozytenaggregate und stellenweise Fibrin nachweisen (Abb. 22). Die Mehrzahl der Thrombozyten ist zu diesem Zeitpunkt degranuliert. Im lumennahen Bereich der Media erkennt man jetzt Zellen mit gut ausgebildetem, schlauchförmigem rauhem endoplasmatischem Reticulum sowie zahlreichen Mitochondrien und Ribosomen (Abb. 23). Diese Merkmale weisen auf eine hohe Stoffwechselaktivität dieser Zellen hin, bei denen es sich sehr wahrscheinlich um modifizierte glatte Muskelzellen handelt.
Abbildung 24 zeigt den luminalen Bereich einer Arterie eines mit Heparin behandelten Tieres, 5 Tage nach Unterkühlung des Gefäßes. Deutlich erkennbar ist eine Zelle, die sich zum einem Teil in der Media, zum anderen in der subendothelialen Zone bzw. in einem Spalt in der Lamina elastica interna befindet. In der gesamten Zelle sind Myofibrillen zu sehen. Offenbar handelt es sich bei ihr um einen modifizierten Myozyten, der von der Media in die Intima migriert. Weiterhin wurden ähnliche Zellen an anderen Stellen der Intima beobachtet (Abb. 21). Diese stellen wahrscheinlich Myozyten nach erfolgter Migration oder Teile migrierender Muskelzellen dar.

Auch bei den unbehandelten Tieren lassen sich Anzeichen für die Migration medialer Muskelzellen in die Intima nachweisen.

Zu beiden Untersuchungszeitpunkten konnten elektronenmikroskopisch keine Unterschiede zwischen Heparin- und Kontrolltieren erfaßt werden.

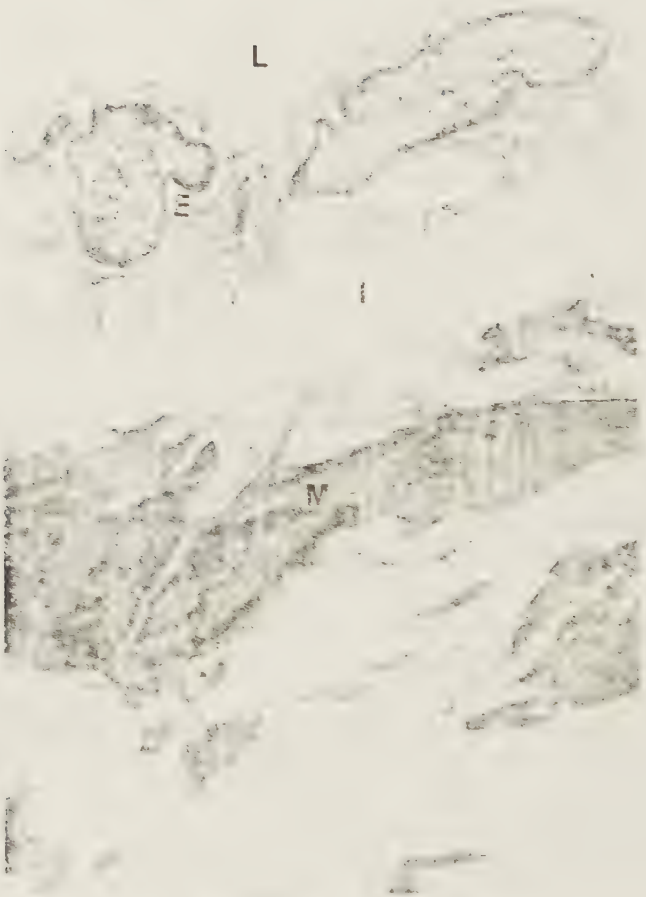

Abb. 17: Luminaler Bereich einer ungeschädigten Arteria carotis der Ratte (L = Gefäßlumen); Vergr. 10 000 x. Endothelzeller (E) haften mit pseudopodienartigen Ausläufern auf der Lamina elastica interna (I). In der obersten Schicht der Media sind länglich-ovale Myozyten (M) deutlich zu erkennen.

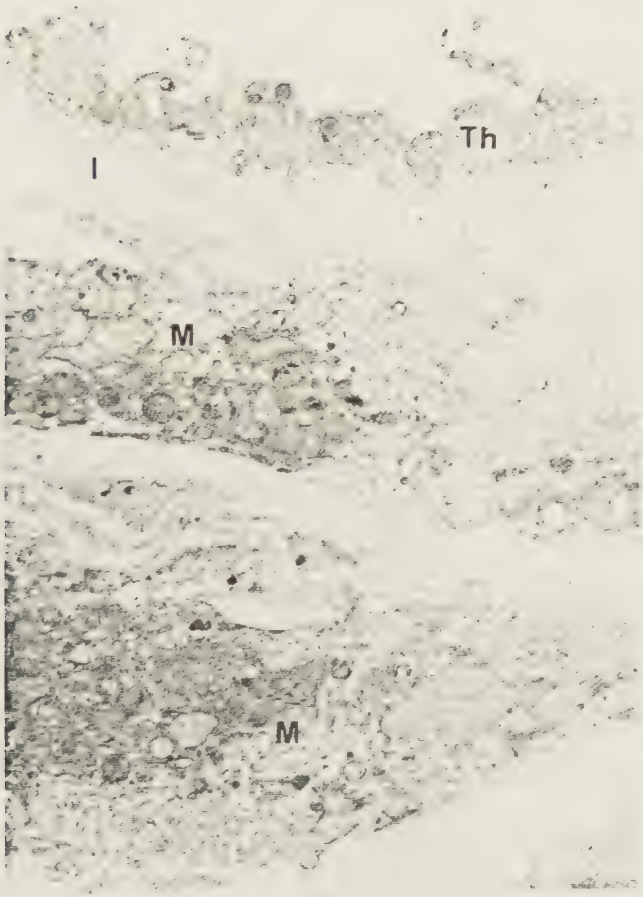

Abb. 18: Arteria carotis eines Kontrolltieres, 4 Stunden nach Unterkühlung; Vergr. 1o 58o x. Die Arterie ist im Bereich der Schädigung deendothelialisiert. Auf der Lamina elastica interna (I) bzw. auf dem subendothelialen Bindegewebe finden sich degranulierte Thrombozyten (Th) in einschichtiger Lage. Einzelne Muskelzellen (M) sind stark geschwollen.

Abb. 19: Arteria carotis eines Kontrolltieres, 4 Stunden nach Unterkühlung; Vergr. 11 500 x. Im Bereich des entfernten Endothels ist eine mehrschichtige Lage von Thrombozyten (Th) zu erkennen, von denen einige weitestgehend degranuliert sind. Die Muskelzellen (M) scheinen unverändert.

Abb. 2o: Arteria carotis eines heparinisierten Tieres, 4 Stunden nach Unterkühlung; Vergr. 1o ooo x. Im deendothelialisierten Bereich finden sich wandständige, teilweise degranulierte Thrombozyten (Th).

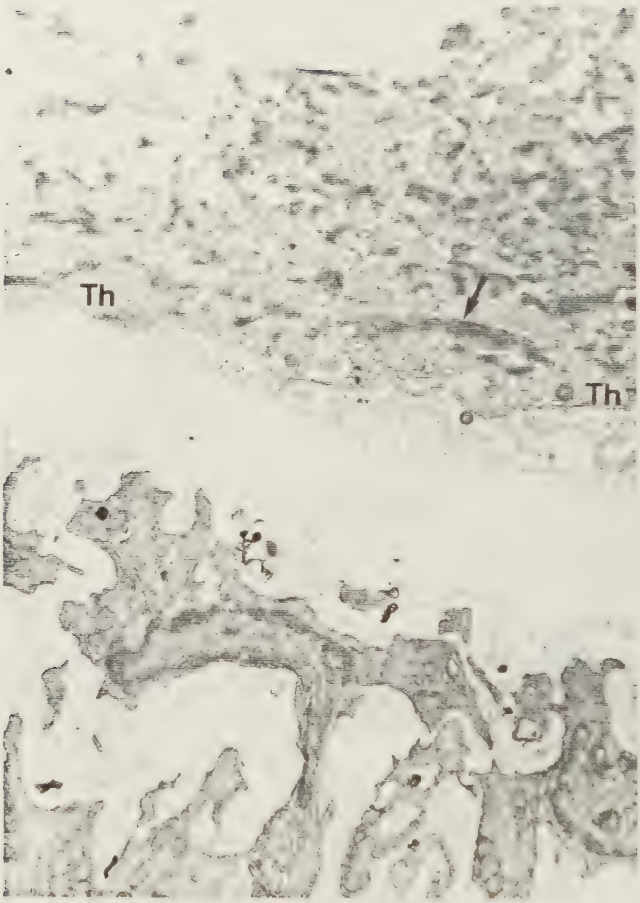

Abb. 21: Arteria carotis eines heparinisierten Tieres, 4 Stunden nach Unterkühlung; Vergr. 11 ooo x. Deutlich erkennbar ist ein kleiner Thrombus, der aus degranulierten Thrombozyten (Th) und Fibrin (→) besteht.

Abb. 22: Arteria carotis eines heparinisierten Tieres, 5 Tage nach Unterkühlung; Vergr. 11 ooo x. Im luminalen Bereich liegen in amorphem Material degranulierte Thrombozyten (Th). Ferner sind Zellen (Z) zu sehen, bei denen es sich möglicherweise um migrierte modifizierte glatte Muskelzellen handelt.

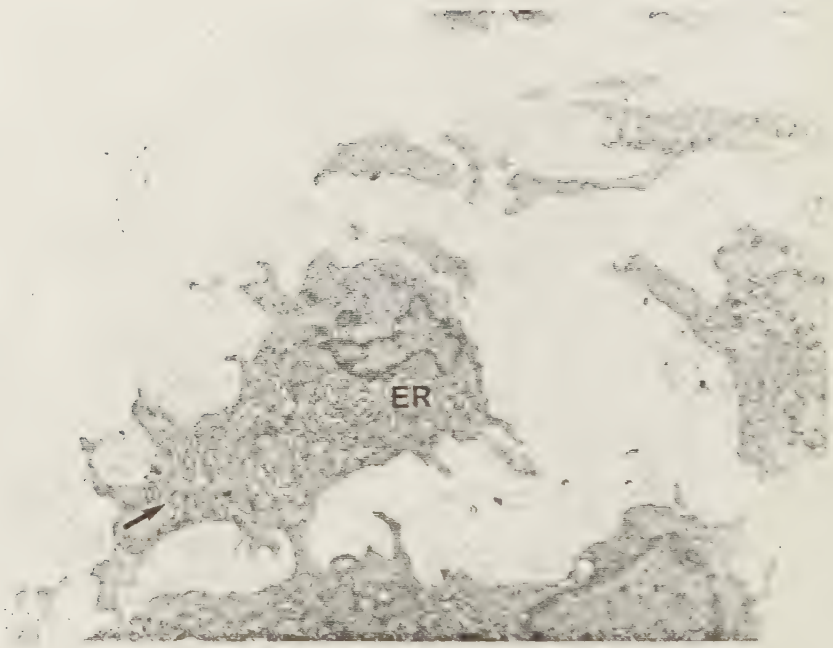

Abb. 23: Arteria carotis eines heparinisierten Tieres, 5 Tage nach Unterkühlung; Vergr. 12 ooo x. Im luminalen Bereich sind weder zelluläre Bestandteile noch Fibrinablagerungen zu erkennen. In der obersten Schicht der Media liegen Zellen mit gut ausgebildetem, schlauchförmigem rauhem endoplasmatischem Reticulum (ER), vermehrt Mitochondrien (→) und zahlreichen Ribosomen. Bei diesen Zellen handelt es sich sehr wahrscheinlich um modifizierte glatte Muskelzellen.

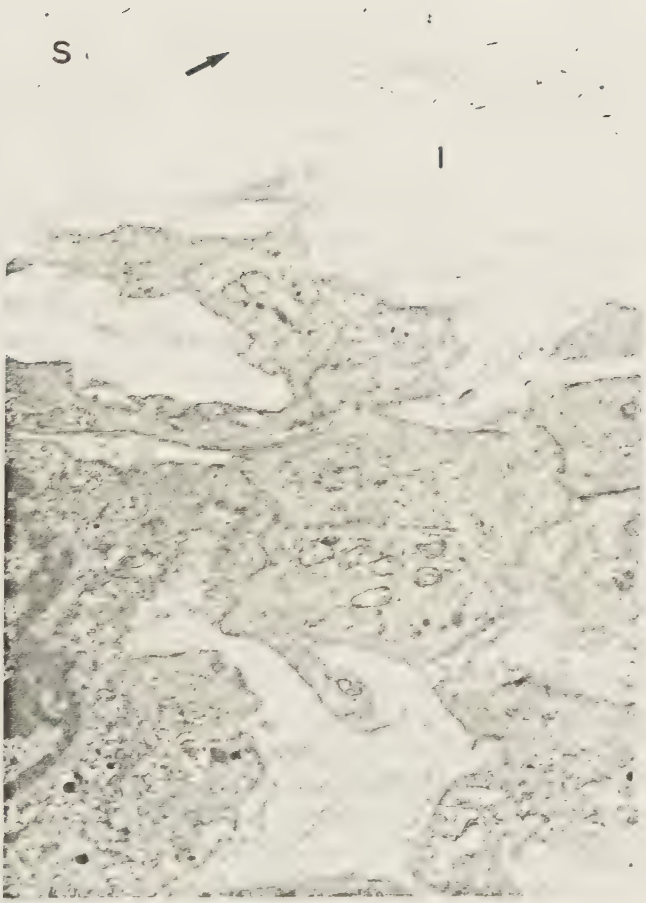

Abb. 24: Arteria carotis eines heparinisierten Tieres, 5 Tage nach Unterkühlung; Vergr. 11 ooo x. Deutlich zu erkennen ist der Durchtritt einer Zelle durch die Lamina elastica interna (I). In der gesamten Zelle sind Myofibrillen (→) zu sehen. Vermutlich handelt es sich um eine modifizierte glatte Muskelzelle, die aus der Media in den subendothelialen Bereich (S) migriert.

4. DISKUSSION

Durch Unterkühlung eines Abschnitts der Arteria carotis communis bei Ratten konnten in den vorliegenden Untersuchungen musculofibröse Intimaproliferationen induziert werden, die mit atherosklerotischen Frühstadien beim Menschen vergleichbar sind. Als zusätzliche atherogene Noxe erhielten die Tiere eine cholesterinreiche Diät während des Versuchs.

Makroskopische sowie licht- und elektronenmikroskopische Beobachtungen ergaben, daß die Plaques zwischen dem 4. und 6. Tag nach Schädigung des Gefäßes durch Proliferation glatter Muskelzellen entstehen, die zuvor von der Media in die Intima migrieren. Dieser Vorgang vollzieht sich im wesentlichen im zentralen Bereich des deendothelialisierten Gefäßabschnitts, wobei zu Anfang mehrere Proliferationsherde entstehen. Am 1o. Tag ist ein Großteil des unterkühlten Bezirks von einer meist zusammenhängenden Proliferation bedeckt, deren Feuchtgewicht im Mittel Werte zwischen 23o und 35o µg erreicht.
Die glatten Muskelzellen im lumennahen Bereich der Media weisen 5 Tage nach Schädigung der Arterie charakteristische Veränderungen auf. Diese bestehen im wesentlichen in einer Vermehrung der Zellorganellen, insbesondere der Mitochondrien und des rauhen endoplasmatischen Reticulums. Derartige Zellen können häufig innerhalb der Lamina elastica interna beobachtet werden. Ähnliche Befunde wurden auch von anderen Untersuchern erhoben (15, 25, 47, 68, 77, 79, 86). Chamley-Campbell und Campbell stellten fest, daß der Proliferation glatter Muskelzellen in vitro die gleichen beschriebenen Veränderungen vorausgehen, und sprechen von einer phänotypischen Modulation dieser Zellen (13).

Der Azofarbstoff Evans Blue bildet Komplexe mit Serumproteinen, besonders mit Albumin (6o). In zahlreichen Untersuchungen wurde er daher als Indikator für lokale Erhöhun-

gen der Gefäßpermeabilität und Endothelläsionen verwendet (2, 5, 15, 21, 27, 29, 32, 59, 6o, 63, 66, 76, 78, 8o, 84). Verschiedene Autoren kamen zu dem Ergebnis, daß nach Schädigung einer Arterie neu gebildetes Endothel eine geringere Permeabilität gegenüber Evans Blue aufweist als nicht reendothelialisierte Bereiche bzw. Stellen, an denen sich Muskelzellproliferationen bilden (15, 29, 8o).
In den von uns durchgeführten Untersuchungen zeigte sich, daß bei Tieren, denen nach Unterkühlung der Arteria carotis Evans Blue injiziert wurde, die dunkelblaue Läsion deutlich von den fast weißen, ungeschädigten Bereichen zu unterscheiden war. Im Vergleich zu einer ungeschädigten Arterie erreichte die reextrahierte Farbstoffmenge bei unbehandelten Tieren ungefähr den sechsfachen Wert, verringerte sich jedoch kontinuierlich in den Tagen im Anschluß an die Unterkühlung des Gefäßes. Makroskopisch konnte in diesem Zeitraum festgestellt werden, daß sich die Größe der angefärbten Fläche verringerte, wobei der zentrale Bereich stets intensiv blau gefärbt blieb. Daraus läßt sich schließen, daß die Reendothelialisierung des unterkühlten Abschnitts von den ungeschädigten Rändern her erfolgt, während die musculo-fibrösen Plaques im Zentrum der Läsion entstehen. Weiterhin zeigte sich, daß bei einem lediglich partiellen Endothelverlust der Defekt offenbar so schnell reendothelialisiert wird, daß Intimaproliferationen nur bei wenigen Tieren und in geringem Ausmaß auftreten. Beide Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß für das Entstehen von myointimalen Veränderungen die Dauer der Deendothelialisierung von entscheidender Bedeutung ist, was bereits von Fishman et al. vermutet wurde (25).

Ein Einfluß der erwähnten cholesterinreichen Diät auf das Proliferationsgewicht konnte nicht festgestellt werden. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Untersuchungen, die Clowes et al. an nomo- und hyperlipidämischen Ratten durchführten (16). Allerdings kommt es sowohl in der Proliferation als auch in darunterliegenden Schichten der Media zu einer deutlichen Lipidakkumulation, die ein weiteres Charakteristikum atherosklerotischer Veränderungen beim Menschen darstellt.

Wie in der Einleitung bereits angedeutet existiert eine Vielzahl experimenteller Modelle, in denen ohne Schädigung einer Arterie myointimale Verdickungen lediglich durch die Verabreichung einer atherogenen, meist cholesterinreichen Diät bei verschiedenen Spezies (Kaninchen, Schwein, Primaten) induziert werden. Hierbei beträgt jedoch der Zeitraum bis zum Auftreten von Intimaproliferationen mehrere Wochen bis Monate. Demgegenüber konnten bei den vorliegenden Untersuchungen musculo-fibröse Plaques bei der Ratte, einem relativ atheroskleroseresistenten Tier, bereits nach wenigen Tagen beobachtet werden.

Aus den genannten Gründen sehen wir die über mehrere Tage anhaltende, vollständige Deendothelialisierung eines Arterienabschnitts als entscheidenden atherogenen Stimulus in dem von uns verwendeten Modell an. Die Ergebnisse weisen erneut auf den engen Zusammenhang zwischen Endothelschädigung und Muskelzellproliferation hin, sowie deren Bedeutung im pathogenetischen Geschehen der Atherosklerose.

Es konnte gezeigt werden, daß sowohl die Inzidenz als auch das Ausmaß der induzierten musculo-fibrösen Plaques durch die Behandlung mit Heparin in einer Dosis von 2 x 5 mg/kg/die s.c., entsprechend 1500 USP E/kg/die, in hohem Maße unterdrückt werden können. Dabei liegt die auf das Proliferationsgewicht bezogene Hemmung von 77 % bis 98 % in einem Bereich, der in ähnlichen Modellen auch von anderen Untersuchern erzielt wurde (38, 75). Auch bei niedrigeren Dosen wird der antiproliferative Effekt deutlich, allerdings ist die Hemmung weniger stark ausgeprägt, und die Unterschiede zu den Kontrollgruppen sind aufgrund der hohen Streuung teilweise nicht signifikant. Daher wurde bei den weiteren Untersuchungen Heparin ausschließlich in der höchsten Dosis appliziert. Eine unterschiedliche Wirksamkeit von Heparin in Abhängigkeit von der verabreichten Diät wurde nicht festgestellt. Darüberhinaus zeigte sich trotz der Normalisierung des Triglyceridspiegels im Plasma weder lichtmikroskopisch noch bei

der Sudan-IV-Reextraktion eine Beeinflußung der Lipidakkumulation im Bereich der geschädigten Arterienwand. Bei diesen Ablagerungen handelt es sich sehr wahrscheinlich im wesentlichen um Cholesterin, welches in hohem Maß in der Fettdiät enthalten ist und in seiner Plasmakonzentration durch Heparin kaum beeinflußt wird (74). Berücksichtigt man ferner den geringen Einfluß der Fettdiät auf das Wachstum der Proliferationen, so wird deutlich, daß der antiproliferative Effekt von Heparin innerhalb des verwendeten Modells nicht auf seiner hypolipidämischen Wirkung beruht.

Licht- und elektronenmikroskopisch sowie makroskopisch wurde beobachtet, daß die Intimaproliferationen bei heparinisierten Tieren im gleichen Zeitraum wie bei Kontrolltieren, also ungefähr nach 5 Tagen, durch Migration glatter Muskelzellen entstehen. Obwohl die lichtmikroskopischen Befunde zeigen, daß bei einigen Tieren Proliferationen vollständig unterdrückt wurden, weisen die Arterien der meisten mit Heparin behandelten Ratten im Gegensatz zu denen der Kontrolltiere auch am 1o. Tag einzelne, isolierte Proliferationsherde mit einer durchschnittlichen Dicke von 2 bis 4 Zellschichten auf. Wir nehmen daher an, daß Heparin weniger die Migration der Myozyten beeinflußt, als vielmehr deren Proliferation im Bereich der Intima hemmt.
Es ist zwar wahrscheinlich, daß bei der makroskopischen Präparation der Arterien heparinisierter Tiere einige Proliferationen nicht erfaßt werden konnten, jedoch liegen diese in einer Größenordnung, die ohnehin eine Gewichtsbestimmung undurchführbar erscheinen läßt.

Bei der in den vorliegenden Untersuchungen am meisten verwendeten Dosis von 2 x 5 mg/kg/die s.c. kommt es zu einer ausgeprägten, systemischen Antikoagulation. Dies zeigt sich in einer Verlängerung der partiellen Thromboplastinzeit auf ungefähr das Doppelte, 1 Stunde nach Applikation. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, daß die erste postoperative Heparinapplikation nach ca. 4 Stunden erfolgte, so daß die bis zu diesem Zeitpunkt ablaufenden Veränderungen bei unbe-

handelten und heparinisierten Tieren identisch sind. Weiterhin wurde während des Versuchs in 8- bzw. 16- stündigem Abstand appliziert. Berücksichtigt man die kurze Halbwertszeit von Heparin bezüglich seiner antikoagulatorischen Wirkung, so muß man annehmen, daß zwischen den einzelnen Applikationen wieder eine annähernde Normalisierung des Gerinnungsstatus eintritt. Inwieweit dies an der Stelle des Endothelverlustes eine Rolle spielt, kann nicht entschieden werden, da es hier möglicherweise zu einer erheblichen Anreicherung von Heparin kommt.
Elektronenmikroskopisch wurden jedoch auch bei heparinisierten Tieren sowohl 4 Stunden als auch 5 Tage nach Unterkühlung der Arterie Adhäsion und Degranulation von Thrombozyten sowie Fibrinablagerungen im Bereich der Läsion beobachtet. Die Freisetzung mitogener Thrombozytenfaktoren sowie die Entstehung von Thrombin sind daher auch unter der Behandlung mit Heparin als sehr wahrscheinlich anzusehen.

Unsere Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die Hemmung der induzierten Intimaproliferationen durch Heparin nicht auf seine antikoagulatorische Eigenschaft oder auf eine Beeinflußung der Thrombozytenfunktion zurückzuführen ist.
Diese Ansicht wird von zwei Untersuchungen aus jüngster Zeit unterstützt. Guyton et al. gelang es nachzuweisen, daß selbst eine kontinuierliche i.v. Injektion von Heparin die Adhäsion von Thrombozyten in einem geschädigten Arterienabschnitt nicht beeinflußt, und daß der antiproliferative Effekt verschiedener Heparinfraktionen nicht von der antikoagulatorischen Aktivität abhängt (38). Eine in vitro -Studie über den Einfluß von Heparin auf das Wachstum arterieller glatter Muskelzellen ergab, daß die antiproliferative Wirksamkeit von Heparin weder auf die Antithrombinwirkung noch auf eine Inaktivierung des mitogenen Thrombozytenfaktors PDGF zurückzuführen ist (44).

Sowohl durch Senkung der Zell- bzw. Gefäßpermeabilität als auch durch beschleunigte Regeneration eines Endotheldefekts könnte Heparin möglicherweise die Stimulation der glatten Muskelzellen durch atherogene Plasmafaktoren (LDL, Thrombin, PDGF etc.)

unterdrücken. Während Heparin das Wachstum von Endothelzellkulturen fördert (44), konnte eine beschleunigte Reendothelialisierung in vivo nicht nachgewiesen werden (18, 38). Der Einfluß von Heparin auf die Gefäßpermeabilität nach Endothelschädigung ist unseres Wissens bisher noch nicht untersucht worden.
Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit Evans Blue ermöglichen die Beurteilung sowohl der Permeabilität als auch der Reendothelialisierung im Bereich des geschädigten Gefäßabschnitts. Bei ungeschädigten Arterien unbehandelter und heparinisierter Ratten konnte keine unterschiedliche Farbstoffeinlagerung festgestellt werden. Überraschenderweise ist 3 und 6 Stunden nach der Operation die Anreicherung von Evans Blue in den unterkühlten Gefäßabschnitten bei behandelten Tieren gegenüber den Kontrolltieren signifikant vermehrt. In den darauffolgenden Tagen sind die Unterschiede zwischen beiden Gruppen jedoch äußerst gering und statistisch nicht signifikant. Während des Großteils der Versuchszeit besteht somit zwischen Heparin- und Kontrolltieren kein Unterschied bezüglich der Permeabilität innerhalb des geschädigten Gefäßabschnitts.
Zwischen dem 1o. und 14. Tag weichen die Werte erneut voneinander ab. Bei den Arterien der Kontrolltiere wurde eine deutlich stärkere Einlagerung von Evans Blue gemessen als bei den Gefäßen der mit Heparin behandelten Ratten. Der Grund hierfür liegt sehr wahrscheinlich in einer stärkeren Farbstoffanreicherung in den Proliferationen der Kontrolltiere, da, wie bereits erwähnt, myointimale Verdickungen im Vergleich zu neu gebildetem Endothel wesentlich mehr Evans Blue einlagern. Das Wachstum und die Häufigkeit des Auftretens der Intimaproliferationen werden jedoch bei den heparinisierten Tieren stark unterdrückt.

Wie beschrieben äußert sich die Reendothelialisierung der Läsion in der kontinuierlichen Abnahme der Farbstoffeinlagerung. Zwischen dem 1. und 8. Tag nach Unterkühlung der Arterie ist der Kurvenverlauf beider Gruppen nahezu identisch, was darauf hinweist, daß bei den heparinisierten Ratten

keine beschleunigte Reendothelialisierung stattfindet. Während sich die Meßwerte bei den Kontrolltieren nach dem 8. Tag nicht mehr wesentlich verändern, sinken sie bei den heparinisierten Ratten weiter ab und bleiben erst nach dem 1o. Tag weitgehend konstant, erreichen jedoch in beiden Gruppen nicht die Werte, die für ungeschädigte Arterien ermittelt wurden. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die Endothelregeneration am 1o. Tag größtenteils abgeschlossen ist, obwohl eine Überlagerung durch die möglicherweise zunehmende Farbstoffanreicherung in den wachsenden Intimaproliferationen nicht auszuschließen ist. Doch wurden zu diesem Zeitpunkt auch lichtmikroskopisch nur noch wenige vollständig deendothelialisierte Arterienquerschnitte beobachtet. Ferner zeigen die Befunde, daß die entstandene Neointima eine höhere Permeabilität als das Endothel ungeschädigter Arterien besitzt.

Somit konnte gezeigt werden, daß Heparin weder eine Senkung der durch Deendothelialisierung erhöhten Gefäßpermeabilität bewirkt, noch die Regeneration von Endothel im geschädigten Bereich beschleunigt.

Der wohl auffälligste Befund dieser Arbeit ist der hohe antiproliferative Effekt von Heparin bei einer Kurzzeitbehandlung im Anschluß an die Operation. So beträgt bei lediglich dreimaliger Applikation die Reduktion des Proliferationsgewichts bezogen auf die Kontrolltiere nach 1o Tagen 8o %, nach 2o Tagen 5o %. Demgegenüber ist der Effekt einer erst in der Versuchsmitte einsetzenden Behandlung wesentlich geringer. Während nach der Applikation vom 6. bis zum 1o. Tag noch eine Hemmung von 5o % vorliegt, ist eine Beeinflußung des Proliferationsgewichts durch die Behandlung vom 1o. bis zum 2o. Tag nicht mehr festzustellen. Diese Ergebnisse zeigen, daß Heparin keine Regression myointimaler Veränderungen bewirkt, sondern bei prophylaktischer Gabe die Proliferation glatter Muskelzellen unterdrückt.

Die beschriebenen Befunde lassen sich mit der Annahme einer

direkten, möglicherweise rezeptorgebundenen Wirkung von Heparin auf die glatten Muskelzellen erklären, die von einigen Untersuchern in jüngster Zeit diskutiert wird. Chamley-Campbell und Campbell kamen aufgrund ihrer Ergebnisse zu der Ansicht, daß die Zellteilung arterieller glatter Muskelzellen durch eine chalonähnliche Substanz unterdrückt wird, deren Wirkung ebenfalls Heparin zukommen könnte (13). Interessant ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, daß Myozyten zur Synthese großer Mengen von Glykosaminoglykanen befähigt sind, die in hoher Konzentration in der Intima und Media von Arterien enthalten sind (66, 67, 81, 83) und möglicherweise im Sinne einer negativen Rückkopplung eine physiologische Hemmung der Proliferation glatter Muskelzellen bewirken (38). Bei einer Zerstörung der subendothelialen Mucopolysaccharidschicht nach experimentellen Endothelschädigungen könnte Heparin ihre Funktion übernehmen und so seinen antiproliferativen Effekt entfalten (38). Der hohe Effekt von Heparin nach nur dreimaliger Applikation läßt sich somit einerseits auf eine länger bestehende Anreicherung im deendothelialisierten Gefäßabschnitt zurückführen; auf diese Weise wäre Heparin in der Lage, die erst am 5. Tag einsetzende Proliferation der migrierenden Muskelzellen zu unterdrücken. Andererseits ist denkbar, daß Heparin wesentliche Veränderungen innerhalb der ersten 36 Stunden nach Unterkühlung der Arterie beeinflußt. Diese Möglichkeit erscheint uns unwahrscheinlich, da sowohl die Aktivierung des Gerinnungssystems als auch die Adhäsion und Degranulation von Thrombozyten bis zum Zeitpunkt der ersten Heparinapplikation erfolgt sind, und offenbar kein Einfluß auf die Migration der Myozyten besteht. Dies läßt vermuten, daß Heparin die Vermehrung der Muskelzellen erst nach erfolgter Migration hemmt.

Auch die Ergebnisse, die mit einer später einsetzenden Heparinbehandlung erzielt wurden, stehen in Einklang mit der beschriebenen Hypothese. So kann die fehlende Regressionswirkung auf bereits entstandene Proliferationen darauf zu-

rückgeführt werden, daß Heparin lediglich mit den oberflächlich gelegenen Muskelzellen in Kontakt kommt, während sich deren Vermehrung in tieferen Schichten der Intimaverdickung ungehemmt vollzieht. Dagegen beruht der Effekt einer bereits am 6. Tag einsetzenden Behandlung wahrscheinlich darauf, daß zu diesem Zeitpunkt einerseits die Migration der Muskelzellen noch nicht abgeschlossen ist, andererseits die entstandenen Proliferationen ein wesentlich kleineres Volumen als am 1o. Tag haben. Somit könnte die Vermehrung eines Teils der Zellen unterdrückt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß der antiproliferative Effekt von Heparin im Rahmen des verwendeten Modells sehr wahrscheinlich weder auf der antikoagulatorischen noch auf der hypolipidämischen Wirkkomponente beruht. Ferner konnte eine Beeinflußung der Gefäßpermeabilität und der Reendothelialisierung nicht nachgewiesen werden. Die Befunde weisen auf eine länger bestehende Anreicherung von Heparin im deendothelialisierten Gefäßabschnitt hin und stehen in Einklang mit der Hypothese einer direkten Wirkung auf die glatten Muskelzellen. Von entscheidender Bedeutung für die Wirksamkeit von Heparin ist eine prophylaktische, vor der Migration der Myozyten erfolgende Applikation. Demgegenüber erscheint eine Regression bestehender myointimaler Veränderungen durch Heparin unwahrscheinlich.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit Untersuchungen über die Wirkung von Heparin auf Intimaproliferationen, die durch Kombination zweier Noxen - Unterkühlung eines Abschnitts der linken Arteria carotis communis und cholesterinreiche Diät - bei Ratten induziert werden.

Es konnte gezeigt werden, daß Heparin bei prophylaktischer Gabe das Wachstum der entstehenden Muskelzellproliferationen dosisabhängig unterdrückt. Die auf das Proliferationsgewicht bezogene Hemmung liegt bei der höchsten Dosis (2 x 5 mg/kg/die s.c.) zwischen 77 % und 98 %.
Untersuchungen mit Hilfe des Azofarbstoffs Evans Blue ergaben, daß Heparin weder eine Senkung der Permeabilität noch eine beschleunigte Endothelregeneration im Bereich des geschädigten Gefäßabschnitts bewirkt.
Durch Variation von Applikationsbeginn und -dauer wurde festgestellt, daß eine Regression bestehender myointimaler Veränderungen unter einer Heparinbehandlung nicht erfolgt. Demgegenüber ist der Effekt einer kurzzeitigen Behandlung im Anschluß an die Schädigung des Gefäßes überraschend hoch.
Die quantitativen Ergebnisse werden durch licht- und elektronenmikroskopische Beobachtungen ergänzt.

Pathogenetische Fragen und mögliche Mechanismen des antiproliferativen Effekts von Heparin werden diskutiert.

6. T A B E L L E N

Dosis (mg/kg/die) s.c.	n	Proliferationsgewicht (µg) $\pm s_{\bar{x}}$	Hemmung (%)	Statist. Signifikanz (p-Wert)	PTT Verlängerung (%)	Statist. Signifikanz (p-Wert)
FETTDIÄT						
Kontr.	8	355 ± 64	-	-	-	-
2 x 0.5	8	185 ± 44	48	< 0.05	2.2	n.s.
2 x 1.5	7	243 ± 83	32	n.s.	31.7	< 0.001
2 x 5.0	8	15 ± 8	96	< 0.001	181.9	< 0.001
NORMALFUTTER						
Kontr.	8	244 ± 50	-	-	-	-
2 x 0.5	8	196 ± 57	20	n.s.	5.1	n.s.
2 x 1.5	8	110 ± 35	55	< 0.05	20.4	< 0.001
2 x 5.0	8	29 ± 11	88	< 0.001	217.4	< 0.001

Tab. 1: Antiproliferativer Effekt von subcutan appliziertem Heparin über 10 Tage nach experimentell erzeugter Intimaproliferation (Ratte, li. A. carotis) bei Fettdiät und Normalfutter. Partielle Thromboplastinzeit bei Versuchsende.
n.s. = nicht signifikant

	Fettdiät		Normalfutter		
Dosis (mg/kg/die) s.c.	n	$\frac{E \cdot 10^{-5}}{\text{Wandgewicht } (\mu g)}$ $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	n	$\frac{E \cdot 10^{-5}}{\text{Wandgewicht } (\mu g)}$ $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	Statist. Signifikanz (p-Wert)
Kontr.	8	5.00 ± 0.36	8	3.21 ± 0.09	<0.001
2 x 0.5	8	4.84 ± 0.48	8	3.74 ± 0.45	>0.1
p vs. Ko.		>0.7		>0.2	
2 x 1.5	8	4.84 ± 0.52	8	3.55 ± 0.09	<0.05
p vs. Ko.		>0.8		<0.05	
2 x 5.0	8	4.49 ± 0.35	8	3.46 ± 0.19	<0.025
p vs. Ko.		>0.3		>0.2	

Tab. 2: Lipidgehalt des unterkühlten Arterienabschnitts (Ratte, li. A. carotis) und Beeinflussung durch subcutan appliziertes Heparin bei Fettdiät und Normalfutter über 10 Tage nach Schädigung des Gefäßes. Sudan-IV-Färbung, Gewichtsbestimmung des Arterienabschnitts, Reextraktion des Farbstoffs, photometrische Messung. Angegeben sind der Quotient aus Extinktion und Wandgewicht, Mittelwerte, Streuung ($\pm s_{\bar{x}}$) und statistische Signifikanzen.

	Extinktion x 10^{-3}						$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	Statist. Signif. (p vs. Ko.)
Kontr.	45	35	30	27	31	35	34	± 3	-
Heparin	30	32	42	27	29	33	32	± 2	>0.6

Tab. 3: Photometrische Messung des reextrahierten Farbstoffs (Evans Blue) bei 623 nm ohne Unterkühlung der A. carotis. 2 Stunden vor Exitus Heparin (5 mg/kg s.c.) bzw. 0.9 %-ige Kochsalzlösung. 1 Stunde vor Exitus Evans Blue (20 mg/kg i.v.). (Tiergewicht: 260 - 300 g)

		Extinktion x 10^{-3}			
Zeitpunkt nach Unterkühlung	Kollektiv	Kontrolle $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	Heparin $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	Statist. Signifik. (p-Wert)	n
3 Std. p.op.	A	178 ± 5	224 ± 13	< 0.01	6
6 Std. p.op.		176 ± 11	210 ± 10	< 0.05	6
1 Tag p.op.	B	191 ± 12	217 ± 5	n.s.	6
2 Tage p.op.		183 ± 11	177 ± 9	n.s.	6
4 Tage p.op.		163 ± 11	166 ± 10	n.s.	6
6 Tage p.op.		112 ± 10	120 ± 7	n.s.	6
8 Tage p.op.		95 ± 9	96 ± 12	n.s.	6
10 Tage p.op.		94 ± 8	62 ± 9	< 0.025	6
12 Tage p.op.	C	97 ± 8	62 ± 8	< 0.02	6
14 Tage p.op.		70 ± 9	59 ± 4	n.s.	6

Tab. 4: Permeabilitätsänderung im Bereich der Läsion bei unbehandelten und heparinisierten Tieren (2 x 5.0 mg/kg/die s.c.) an verschiedenen Zeitpunkten nach Unterkühlung des Gefäßes (Ratte, li. A. carotis). Photometrische Messung des reextrahierten Farbstoffs Evans Blue. Angegeben sind Mittelwert ($\bar{x}$), Streuung ($\pm s_{\bar{x}}$) und statistische Signifikanz.
(Tiergewichte: A 215 - 260 g, B 170 - 210 g, C 165 - 225 g).

	6 Tage p.op.		8 Tage p.op.		10 Tage p.op.	
	Kontr.	Heparin	Kontr.	Heparin	Kontr.	Heparin
Proliferationsgewicht (µg)	7	0	78	0	265	0
	2	0	103	0	175	0
	15	2	124	15	198	37
	7	0	16	0	213	0
	8	0	168	0	398	0
	18	0	36	0	0	0
	20	0	48	0	490	39
	8	0	77	25	105	0
	3	0	144	0	338	0
	15	2	158	0	173	0
$\bar{x}$	10	0	95	4	236	8
$\pm s_{\bar{x}}$	$\pm$ 2	$\pm$ 0	$\pm$ 17	$\pm$ 3	$\pm$ 45	$\pm$ 5
Statist. Signifik. (p-Wert)	< 0.001		< 0.001		< 0.001	

Tab. 5: Proliferationsgewicht 6, 8 und 10 Tage nach Unterkühlung des Gefäßes (Ratte, li. A. carotis) bei unbehandelten und heparinisierten Tieren. Dosis: 2 x 5.0 mg/kg/die s.c. Angegeben sind Mittelwert ($\bar{x}$), Streuung ($\pm s_{\bar{x}}$) und statistische Signifikanz. (Tiergewicht: 120 -150 g).

	n	Proliferationsgewicht (µg) $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	Hemmung (%)	Statistische Signifikanz (p vs. Ko.)
A	10	277 ± 44	-	-
B	10	55 ± 21	80	< 0.001
C	10	20 ± 6	93	< 0.001
D	9	5 ± 4	98	< 0.001
E	10	140 ± 37	50	< 0.05

Tab. 6: Effekt von Heparin (10 mg/kg/die s.c.) bei Variation von Applikationsbeginn und -dauer auf experimentell erzeugte Intimaproliferationen (Ratte, li. A. carotis). Versuchsdauer 10 Tage. (Tiergewicht: 150 - 180 g)

	n	Proliferationsgewicht (ug) $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	Hemmung (%)	Statistische Signifikanz (p vs. Ko.)
F	10	276 ± 64	-	-
G	10	645 ± 123	-	-
H	10	322 ± 72	50	< 0.05
I	10	223 ± 111	66	< 0.02
J	10	148 ± 71	77	< 0.005
K	10	623 ± 95	3	n.s.

Tab. 7: Effekt von Heparin (10 mg/kg/die s.c.) bei Variation von Applikationsbeginn und -dauer auf experimentell erzeugte Intimaproliferationen (Ratte, li. A. carotis). Versuchsdauer 20 Tage. Hemmung und Signifikanz berechnet auf Gruppe G; n.s. = nicht signifikant. (Tiergewicht: 150 - 180 g)

	n	Plasma-triglyce-ridspiegel (mg/dl) $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	Änderung (%)	Statistische Signifikanz (p vs. Ko.)
F	10	75 ± 8	-	-
G	9	80 ± 8	-	-
H	10	87 ± 11	+9	n.s.
I	9	76 ± 13	-5	n.s.
J	10	30 ± 3	-63	< 0.001
K	10	27 ± 3	-66	< 0.001

Tab. 8: Triglyceridspiegel im Plasma. Änderung und Signifikanz berechnet auf Gruppe G.

7. L I T E R A T U R

1) Ärztliche Praxis, Jahrg. XXV, Nr. 85, 3782 (1973)

2) Anitschkow, N.: Über die Veränderungen der Kaninchenaorta bei experimenteller Cholesterinsteatose. Beitr. path. Anat., Vol. 56, 379-4o4 (1913)

3) Bailey, J.M. et al.: Anti-inflammatory drugs in experimental atherosclerosis; Part 4; Inhibition of atherosclerosis in vivo and thromboxane synthesis and platelet aggregation in vitro. Atherosclerosis, Vol. 32, 195-2o3, hrsg. Elsevier (1979)

4) Bell, F.P., Somer, J.B., Craig, J.H. und Schwartz, C.J.: Patterns of aortic Evans Blue uptake in vivo and in vitro. Atherosclerosis, Vol. 16, 127-133, hrsg. Elsevier (1972)

5) Benditt, E.P.: The origin of atherosclerosis. Scientif. Amer., Vol. 236, 74-85 (1977)

6) Björkerud, S.U. und Bondjers, G.: Arterial repair and atherosclerosis after mechanical injury; Part II. Atherosclerosis, hrsg. Elsevier, Vol. 14, 259-276 (1971)

7) Björkerud, S.U.: Mechanism of atherosclerosis. Pathobiol. Ann., Vol. 9, 277-3o1 (1979)

8) Bondjers, G. und Björnheden, T.: Experimental atherosclerosis induced by mechanical trauma in rats. Atherosclerosis, Vol. 12, 3o1-3o6, hrsg. Elsevier (197o)

9) Brewer, H.B. et al.: Lipoproteine: Struktur, Funktion und Stoffwechsel. Lipoproteine und Herzinfarkt; 7-16, hrsg. Greten, H. et al., Verlag G. Witzstrock (1979)

1o) Bucolo, G. und David, H., Clin. Chem., Vol. 19, 476-482 (1973)

11) Buddecke, E.: Grundriss der Biochemie. De Gruyter, 5. Aufl., 186-189 (1977)

12) Cavallero, C., Sarti, P. und Spagnoli, L.G.: Proliferation of arterial smooth muscle: glucocorticoid effect. Prog. Biochem. Pharmacol., Vol. 14, 88-93, Karger, Basel (1977)

13) Chamley-Campbell, J.H. und Campbell, G.R.: What controls smooth muscle phenotype? Atherosclerosis, Vol. 4o, 347-357, hrsg. Elsevier (1981)

14) Clair, R.W.St., Mitschelen, J.J. und Leight, M.: Metabolism by cells in culture of low density lipoproteins of abnormal composition from non-human primates with diet-induced hypercholesterolemia. Biochemica et Biophysica Acta, Vol. 618, 63-79, hrsg. Elsevier (198o)

15) Clopath, P., Suter, J. und Stäubli, W.: Morphological and biochemical studies of endothelial regeneration. Folia Angiologica, Vol. XXVIII, 58-63, 1/2/3/8o

16) Clowes, A.W. et al.: Absence of enhanced intimal thickening in the response of the carotid arterial wall to endothelial injury in hypercholesterolemic rats. Lab. Inv., Vol. 35, 6-17 (1976)

17) Clowes, A.W. und Karnovsky, M.J.: Failure of certain antiplatelet drugs to affect myointimal thickening following arterial endothelial injury in the rat. Lab. Inv., Vol. 36, 452-464 (1977)

18) Clowes, A.W. und Karnovsky, M.J.: Suppression by heparin of smooth muscle cell proliferation in injured arteries. Nature, Vol. 265, 625-626 (1977)

19) Constantinides, P.: Experimental Atherosclerosis. hrsg. Elsevier Publishing Comp., New York (1965)

2o) Day, C.E., Powell, J.R. und Levy, R.S.: Sulfated polysaccharide inhibition of aortic uptake of low density lipoproteins. Artery, Vol. 1, 126-137 (1975)

21) Duguid, J.B.: Pathogenesis of atherosclerosis. Lancet, Vol. 2, 925-927 (1949)

22) Engelberg, H.: Heparin and atherosclerosis. Monogr. Atheroscl., Vol. 8, 1-69, Karger, Basel (1978)

23) Engelberg, H.: Heparin and atherosclerosis. A review of old and recent findings. American Heart Journal, Vol. 99, No. 3, 359-372 (198o)

24) Enomoto, H. et al.: Effect of THD-341, a new hypocholesterolemic agent, on experimental atherosclerosis in rabbits. Atherosclerosis, Vol. 3o, 1o9-121, hrsg. Elsevier (1978)

25) Fischman, R.A., Ryan, G.B. und Karnovsky, M.J.: Endothelial regeneration in the rat carotid artery and the significance of endothelial denudation in the pathogenesis of myointimal thickening. Lab. Inv., Vol. 32, No. 3, 339-351 (1975)

26) Forth, W., Henschler, W. und Rummel, W.: Pharmakologie und Toxicologie. Wissenschaftsverlag, 3. Aufl., 253 ff. (198o)

27) Friedman, M. und Byers, S.O.: Experimental thrombo-atherosclerosis. J.Clin. Inv., Vol. 4o, 1139-1152 (1961)

28) Friedman, R.J. et al.:Regression of injury-induced atheromatous lesions in rabbits. Arch. Pathol. Lab. Med., Vol. 1oo, 189-195 (1976)

29) Friedman, R.J. et al.: The effect of thrombocytopenia on experimental arteriosclerotic lesion formation in rabbits. J. Clin. Inv., Vol. 6o, 1191-12o1 (1977)

3o) Fukushima, H., Toki, K. und Nakatani, H.: The effect of N-(α-methylbenzyl) linoleamide on experimental atherosclerosis in rabbits. J. Atheroscl. Res., Vol. 9, 57-64, hrsg. Elsevier (1969)

31) Garbarsch, C. et al.: Arteriosclerosis and hypoxia. Part I; Gross and microscopic changes in rabbit aorta induced by systemic hypoxia. Histochemical studies. J. Ather. Res., Vol. 9, 283-294 (1969)

32) Garrison, R.J. et al.: Epidemiologie der koronaren Herzkrankheit: Neue Gesichtspunkte. Lipoproteine und Herzinfarkt; 23-26, hrsg. Greten, H. et al., Verlag G. Witzstrock (1979)

33) Gaynor, E., Bouvier, C. und Spaet, T.H.: Vascular lesions: Possible pathogenetic basis of the generalized Schwartzman reaction. Science, Vol. 17o, 986-988 (197o)

34) Gerrity, R.G. et al.: Endotoxin-induced endothelial injury and repair. Endothelial cell turnover in the aorta of the rabbit. Exp. Molec. Pathol., Vol. 23, 379-385 (1975)

35) Gerrity, R.G., Richardson, M. und Schwartz, C.J.: The morphologic basis of arterial endothelial permeability: some ultrastructural aspects of the Evans Blue model. Atherosclerosis, hrsg. M.D. Haust und G.W. Manning, Vol. 8o, 952-958 (1977)

36) Goldstein, J.L. et al.: Overloading human aortic smooth muscle cells with low density lipoprotein-cholesteryl esters reproduces features of atherosclerosis in vitro. J. Clin. Inv., Vol. 59, 1196-12o2 (1977)

37) Grossman, B.J., Cifonelli, J.A. und Osoa, A.K.: Inhibition of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits by a heparin sulfate. Atherosclerosis, Vol. 13, 1o3-1o9, hrsg. Elsevier (1971)

38) Guyton, J.R. et al.: Inhibition of rat arterial smooth muscle cell proliferation by heparin. In vivo studies. Circ. Res., Vol. 46, 625-634 (198o)

39) Harker, L.A., Slichter, S.J. und Scott, C.R.: Homocystinemia: Vascular injury and arterial thrombosis. N. Engl. J. Med., Vol. 291, 537-543 (1974)

4o) Hassler,O.: The origin of the cells constituting arterial intimal thickening. Lab. Inv., Vol. 22, No. 4, 286-293 (197o)

41) Hiebert, L.M. und Jaques, L.B.: The observation of heparin on endothelium after injection. Thromb. Res., Vol. 8, 195-2o4 (1976)

42) Hollander, W. et al.: Suppression of atheromatous fibrous plaque formation by antiproliferative and anti-inflammatory drugs. Supplement I to Circ. Res., Vol. XXXIV and XXXV, I-131 - I-141 (1974)

43) Hollander, W. et al.: Effects of anticalcifying and antifibrotic drugs on pre-established atherosclerosis in the rabbit. Atherosclerosis, Vol. 33, 111-123, hrsg. Elsevier (1979)

44) Hoover, R.L. et al.: Inhibition of rat arterial smooth muscle cell proliferation by heparin. In vitro studies. Circ. Res., Vol. 47, 578-583 (198o)

45) Jaques, L.B.: Heparin: An old drug with a new paradigm. Science, Vol. 2o6, 528-533 (1979)

46) Jorpes, L.E.: Heparin. Handbuch d. exper. Pharmakol., 143-191, Bd. XXVII, Springer (1971)

47) Jurukova, Z. und Knieriem, H.-J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Organisation arterieller Thromben. Virchows Arch. Abt. A. Path. Anat., Bd. 349, 368-381 (197o)

48) Kirkpatrick, J.B.: Pathogenesis of foam cell lesions in irradiated arteries. Am. J. Pathol., Vol. 5o, 291-31o (1967)

49) Kniker, W.D. und Cochrane, C.G.: The localization of circulating immune complexes in experimental serum sichness. The role of vasoactive amines and hemodynamic forces. J.Exp. Med., Vol. 127, 119-135 (1968)

5o) Lowry, O.H. et al.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., Vol. 193, 265-275 (1951)

51) Luna, G.L.: Manual of histologic staining methods of the armed forces institude of pathology. hrsg. Mc.Graw, Hill Book Comp., New York (1968)

52) Mc.Gill, H.C., Geer, J.C. und Holman, R.L.: Sites of vascular vulnerability in dogs demonstrated by Evans Blue. Arch. Pathol., Vol. 64, 3o3-311 (1957)

53) Meng, K.: Tierexperimentelle Untersuchungen zur antithrombotischen Wirkung von Acetylsalicysäure. Ther. Ber., Vol. 47, 69-79 (1975)

54) Meng, K.: Tierexperimentelle Thrombose und Behandlung mit Acetylsalicylsäure. Med. Welt, Vol. 27, 1359-1362 (1976)

55) Meng, K. und Seuter, F.: Effect of ASA on experimentally induced arterial thrombosis in rats. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., Vol. 3o1, 115-119 (1977)

56) Minick, C.R., Murphy, G.E. und Campbell, W.G.: Experimental induction of athero-arteriosclerosis by synergy of allergic injury to arteries and lipid-rich diet. J. Exp. Med., Vol. 124, 635-652 (1966)

57) Mustard, J.F. und Packham, M.A.: The role of blood and platelets in atherosclerosis and the complications of atherosclerosis. Thrombos. Diathes. Hemorrh., Vol. 33, 444-456 (1975)

58) Nam, S.C. et al.: Rapid production of advanced atherosclerosis in swine by a combination of endothelial injury and cholesterol feeding. Exp. Mol. Pathol., Vol. 18, 369-379 (1973)

59) National Heart and Lung Inst., Task-force on Arteriosclerosis: Arteriosclerosis. (National Institudes of Health, Bethesda, Md., Department of Health, Education, and Welfare, Publ.-No. (NIH) 72-219, Vol. 2, (1971)

6o) Packham, M.A. et al.: Localized protein accumulation in the wall of the aorta. Exp. Mol. Pathol., Vol. 7, 214-232 (1967)

61) Pick, R. und Glick, G.: Effects of propranolol, minoxidil, and clofibrate on cholesterol-induced atherosclerosis in stumptail macaques (Macaca arctoides). Atherosclerosis, Vol. 27, 71-77, hrsg. Elsevier (1977)

62) Robertson, A.L., Jr.: Arterial endothelium in the initial stages of atherogenesis. Atherosclerosis, Vol. V, 1o3-111, hrsg. A.M. Gotto, L.C. Smith und B. Allen, Springer Verlag (1979)

63) Rokitansky, C.V.: A manual of pathological anatomy, Vol.3, The Sydenham Society, London (1852)

64) Ross, R. und Glomset, J.A.: Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. Science, Vol. 18o, 1332-1338 (1973)

65) Ross, R. et al.: A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cell in vitro. Proc. Nat. Acad. Sci., Vol. 71, No. 4, 12o7-121o (1974)

66) Ross, R. und Glomset, J.A.: The pathogenesis of atherosclerosis. New. Engl. J. Med., Vol. 295, No. 7, 369-377 (1976)

67) Ross, R., Glomset, J.A. und Harker, L.: The response to injury and atherogenesis: the role of endothelium and smooth muscle. Ather. Rev., Vol. 3, 69-76, hrsg. R. Paoletti und A.M. Gotto, Jr., Raven Press, New York (1978)

68) Schlote, W., Boellard, J.W. und Betz, E.: Experimental atherosclerosis - the animal model and its relation to human disease. Folia Angiologica, Vol. 28, 76-79, 1/2/3/8o

69) Schmidt, R.: Eine neue Methode zur Erzeugung von Thromben durch Unterkühlung der Gefäßwand und ihre Anwendung zur Prüfung von Acetylsalicylsäure und Heparin. Gießen, Humanmedizin, Dissertation (1975)

7o) Schmidt, R.F. und Thews, G.: Physiologie des Menschen. Springer Verlag, 19. Aufl., 332 ff. (1977)

71) Schröer, H.: Heparin, Prostacyclin und Endothel. Aus: Kontrolle von Antithrombotika, 249-254, hrsg. R. Marx und H.A. Thies, Editiones Roche, Basel-Grenzach-Wyhlen (1981)

72) Schwartz, C.J., Gerrity, R.G. und Lewis, L.J.: Arterial endothelial structure and function with particular reference to permeability. Atherosclerosis Reviews, Vol. 3, 1o9-124, hrsg. R. Paoletti und A.M. Gotto, Jr., Raven Press, New York (1978)

73) Seuter, F., Sitt, R. und Busse, W.D.: Experimentally induced thromboatherosclerosis in rats and rabbits. Folia Angiologica, Vol. XXVIII, 85-87, 1/2/3/80

74) Seuter, F.: unveröffentliche Ergebnisse. Bayer Ag, Inst. f. Pharmakologie, Wuppertal

75) Sitt, R., Seuter, F. und Busse, W.D.: Suppression by heparin of intimal proliferation in the injured carotid artery (rat). Abstract 188 in: Deutsche Pharmakologische Gesellschaft, Abstracts 21st Spring Meeting, Offprint from Naunyn-Schmiedeberg's Arch. of Pharmacol., Supplement to Vol. 311 (1980)

76) Somer, J.B., Evans, G. und Schwartz, C.J.: Influence of experimental aortic coarctation on the pattern of aortic Evans Blue uptake in vivo. Atherosclerosis, Vol. 16, 127-133, hrsg. Elsevier (1972)

77) Spaet, T.H. et al.: Intimal injury and regrowth in the rabbit aorta. Circ. Res., Vol. 36, 58-70 (1975)

78) Statistisches Bundesamt: Statistisches Jahrbuch 1979 für die Bundesrepublik Deutschland, Verlag W. Kohlhammer

79) Stemerman, M.B. und Ross, R.: Experimental atherosclerosis. I. Fibrous plaque formation in primates, an electron microscope study. J. Exp. Med., Vol. 136, 769-789 (1972)

80) Stemerman, M.B. et al.: Intimal healing. Am. J. Pathol., Vol. 81, 125-142 (1977)

81) Stemerman, M.B.: Hemostasis, thrombosis, and atherogenesis. Atherosclerosis Reviews, Vol. 6, 103-146 hrsg. A.M. Gotto und R. Paoletti, Raven Press, New York (1979)

82) Taylor, C.B., Baldwin, D. und Haas, G.M.: Localized arteriosclerotic lesions induced in the aorta of the juvenile rabbit by freezing. Arch. Path., Vol. 49, No. 5, 623-640 (1950)

83) Titus, J.L. und Weilbaecher, D.G.: Smooth muscle cells in atherosclerosis. Atherosclerosis, Vol. V, 126-129, hrsg. A.M. Gotto, L.C. Smith und B. Allen (1980)

84) Virchow, R.: Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. G. Olms Verlag (1858)

85) Weber, G., Fabrini, P. und Resi, L.: Arterial intimal changes in the early phases of experimental atherogenesis. Atherosclerosis Reviews, Vol. 4, 97-117, hrsg. R. Paoletti und A.M. Gotto, Jr., Raven Press, New York (1979)

86) Webster, W.S., Bishop, S.P. und Geer, J.C.: Experimental aortic intimal thickening. I. Morphology and source of intimal cells. Am. J. Pathol., Vol. 76, No. 2, 245-264 (1974)

L E B E N S L A U F

Name: Hardy Sohnius

Geboren: 26.1o.1955

Geburtsort: Rheydt

Eltern: Friedel Sohnius, Amtsrat
Adeline Sohnius, geb. Hurtz

Schulbildung:

1962 - 1965 Gemeinschaftsschule an der Lacombletstraße, Düsseldorf
1966 - 1975 Rethel-Gymnasium, Düsseldorf
4.6.1975 Reifeprüfung

Grundwehrdienst:

1.7.1975 - 3o.9.1976 bei der Bundeswehr

Hochschulstudium:

Wintersemester 76/77 - Sommersemester 78
Studium der Humanmedizin an der Gesamthochschule Essen

August 1978 Ärztliche Vorprüfung

Seit Wintersemester 78/79 Fortsetzung des Studium an der Universität Düsseldorf

März 198o Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

z.Zt. Vorbereitung auf den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

L E B E N S L A U F

Name: Stefan Wohlfeil

Geboren: 14.8.1956

Geburtsort: Düsseldorf

Eltern: Klaus Wohlfeil, Industriekaufmann
Ellinor Wohlfeil, geb. Landauer, Lehrerin

Schulbildung:

1963 - 1965 Kath. Volksschule an der Steinkaul, Düsseldorf-Himmelgeist
1965 - 1966 Ev. Volksschule am Hochfeld, Erkrath-Unterbach
1966 - 1975 Geschwister-Scholl-Gymnasium, Düsseldorf
6.6.1975 Reifeprüfung

Grundwehrdienst:

1.7.1975 - 3o.9.1976 bei der Bundeswehr

Hochschulstudium:

Seit Wintersemester 76/77 Studium der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf

August 1978 Ärztliche Vorprüfung
August 1979 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

z.Zt. Vorbereitung auf den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung